

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARIA ROSA DMENGEON PEDREIRO

**“Estudo comparativo da ação do fluoreto na morfologia branquial de
Notothenia rossii e *Notothenia coriiceps* sob estresse térmico e salino”**

CURITIBA
2010

MARIA ROSA DMENGEON PEDREIRO

“Estudo comparativo da ação do fluoreto na morfologia branquial de *Notothenia rossii* e *Notothenia coriiceps* sob estresse térmico e salino”

Monografia apresentada a disciplina
Estágio em Biologia Celular, como
requisito parcial a conclusão do curso de
Ciências Biológicas, Setor de Ciências
Biológicas, Universidade Federal do
Paraná.

Orientadora: Dra. Lucélia Donatti
Laboratório de Biologia Adaptativa
Departamento de Biologia Celular

Curitiba
2010

“Coisas que os olhos não viram, nem os ouvidos ouviram, nem o coração humano jamais imaginou, tais são os bens que Deus tem preparado para aqueles que o amam.” (I Cor 2,9)

AGRADECIMENTOS

Agradeço...

Primeiramente a Deus, por me amar muito mais do que eu mereço. Por me permitir estudar a vida, em todas as suas formas e dimensões, o que fez com que eu me apaixonasse cada vez mais por sua criação. Por me permitir realizar tantos sonhos, até mesmo os que eu jamais tinha imaginado. Por me ensinar, enfim, que: “Melhor que realizar os meus sonhos, foi poder realizar os sonhos de Deus”.

Aos meus pais: Américo e Terezinha, por terem me sonhado e pela vida que me deram. Pelo apoio, amor, dedicação e força incondicionais. Pela educação e fé que recebi que me tornaram íntegra. Por estarem ao meu lado, amenizando as dificuldades e acreditando sempre, que eu sou capaz de enfrentar meus medos e obstáculos. Sei que sou o que sou hoje, graças a vocês, que nunca, nunca mediram esforços para que eu alcançasse esse sonho.

Aos meus irmãos Filipe e Camila, por fazerem parte da minha história. Pelo apoio, amor e carinho. Pelas risadas intermináveis, me permitindo ter histórias engraçadas até mesmo em momentos difíceis. E por me suportarem em tempos de extremo estresse. Ao Filipe por abrir meus caminhos, sempre e me proteger em todas as situações. A Camila por ser minha companhia em todos os momentos e me alegrar em todos os dias.

A todos das famílias Dmengeon e Pedreiro, por todo o apoio e incentivo. Especialmente à Tia Ivone, minha segunda mãe. E pela empolgação com a primeira Bióloga da família.

A Professora Dr^a Lucélia Donatti, pela orientação, incentivo e amizade. Por sempre me aconselhar e cobrar. Mostrando-me qual caminho trilhar no meio acadêmico. E por me proporcionar uma das experiências mais fantásticas da minha vida: a viagem à Antártica.

Ao amigo Édson Rodrigues Júnior pela elaboração e execução do projeto de sua dissertação e pelo empréstimo do material, sem o qual essa monografia não teria sido realizada. Por todos os ensinamentos durante a nossa estadia na Estação Antártica Comandante Ferraz.

Aos meus amigos inseparáveis: Carol, Marcos, Fabiano, Fernanda e Nádia. Por me presentearem com o seu companheirismo, amizade e força durante esses quatro maravilhosos anos, tornando a realização desse sonho ainda mais intensa e

inesquecível. À Carol, pela amizade desde os primeiros contatos com a Universidade, pela cumplicidade e pelos momentos de ousadia compartilhados a cada final de semestre, nos quais acreditávamos sempre em nossa capacidade de aprendizagem. Ao Marcos pela gentileza e atenção, pelos conselhos e cuidados, e pelas aventuras nas práticas de ensino. Ao Fabiano, por estar sempre disposto a ajudar, e pela paciência em vários momentos de estudos antes das provas. A Fer, por ter conquistado o coração do Fabiano, e por dedicar tanta amizade e carinho sempre estando de prontidão para qualquer coisa, e pelas inúmeras caronas. À Nádia, pelos momentos de descontração no estágio e no curso, pelos congressos e viagens animadíssimas. Agradeço a vocês pelas boas risadas de todos os dias e por todo carinho e apoio. Vocês agora são parte da minha história!

À Priscila, pela amizade e por toda a ajuda no laboratório e fora dele, inclusive nesta monografia. Pelos momentos de cumplicidade e companheirismo. Pelas inúmeras risadas e por nossas viagens repletas de histórias engraçadas.

A professora Flavia Sant`Anna Rios pela simpatia e amizade. A todos os amigos e colegas do laboratório Biologia Adaptativa, especialmente à Luciana Banana, pela amizade e por tornar uma viagem de caminhão tão engraçada.

A Marinha do Brasil, em especial a Secirm, por todo apoio logístico fornecido durante as fases de coleta e realização dos bioensaios. Ao Grupo Base presente na EACF durante a Operação Antártica XXVIII, por todo apoio e amizade.

Ao CNPq, pelo apoio e financiamento durante os dois anos de Iniciação Científica, e que permitiram a realização desta monografia.

A todos, enfim, que de alguma forma estiveram ao meu lado e contribuíram, não só, para a realização desse trabalho, mas também para a minha formação pessoal e profissional. A todos os que acreditaram em mim e vibraram com minhas conquistas. Os meus mais sinceros agradecimentos!

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
3 OBJETIVO	24
3.1 Geral	24
3.2 Específico	24
4 MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1 Área de Estudo	25
4.2 Coleta	26
4.3 Arranjo experimental	28
4.4 Processamento histológico e ultraestrutural	31
4.5 Alterações histológicas analisadas	33
4.6. Teste do Quiquadrado	34
5 RESULTADOS	35
5.1 Descrição da estrutura branquial padrão de <i>N. rossii</i> e <i>N. corriceps</i>	35
5.2 Descrição qualitativa das patologias observadas	37
5.3 Análise quantitativa das patologias observadas	40
5.3.1 Análises histopatológicas de <i>Notothenia rossii</i> – Fluorose induzida por via entérica	40
5.3.2 Análises histopatológicas de <i>Notothenia rossii</i> – Fluorose induzida por via peritoneal	41
5.3.3 Análises histopatológicas de <i>Notothenia corriceps</i> – Fluorose induzida por via entérica	42
5.3.4 Análises histopatológicas de <i>Notothenia corriceps</i> – Fluorose induzida por via peritoneal	43
5.3.5 Análise comparativa das histopatologias encontradas em <i>Notothenia rossii</i> e <i>Notothenia corriceps</i> – Fluorose induzida por via entérica	44
5.3.6 Análise comparativa das histopatologias encontradas em <i>Notothenia rossii</i> e <i>Notothenia corriceps</i> – Fluorose induzida por via peritoneal	45
5.3.7 – Teste de Hipótese	46
6. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO	48
7. REFERÊNCIAS	53

FIGURAS

Figura 1- Posição da Antártica no supercontinente Gondwana.....	14
Figura 2. Continente Antártico cercado pelo Oceano Austral.....	15
Figura 3. Fotografia de <i>Notothenia rossii</i> coletada no momento da pesca na Baía do Almirantado.....	18
Figura 4. Fotografia de <i>Notothenia corriceps</i> , coletada no momento da pesca na Baía do Almirantado.....	19
Figura 5. Fotografia da vista lateral de <i>Notothenia corriceps</i> , mostrando as fendas e os quatro arcos branquiais na cavidade opercular.....	21
Figura 6. Representação das brânquias de peixes teleósteos em aumentos crescentes.....	22
Figura 7: Localização da Estação Antártica Comandante Ferraz.....	25
Figura 8. Botes pneumáticos do tipo “Zodiac”. Captura realizada com linha e anzol.....	27
Figura 9. Mapa da Baía do Almirantado indicando os locais de coleta.....	27
Figura 10. Módulo de aquário da Estação Antártica Comandante Ferraz.....	28
Figura 11. Desenho esquemático do protocolo experimental.....	29
Figura 12. Fluxograma do processamento de Microscopia de Luz.....	31
Figura 13. Fluxograma do processamento de Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	32
Figura 14. Fluxograma do processamento de Microscopia Eletrônica de Varredura.....	33
Figura 15. Morfologia padrão da estrutura branquial de <i>Notothenia rossii</i> e <i>Notothenia corriceps</i> sob as diferentes técnicas de Microscopia utilizadas.....	36
Figura 16. Microscopia de Luz das alterações histopatológicas Branquiais encontradas em <i>Notothenia rossii</i> e <i>Notothenia corriceps</i>	38
Figura 17. Epitélio branquial de <i>N. rossii</i> e <i>N. corriceps</i> em duas técnicas de microscopia.....	39

Figura 18. Porcentagem de lesões histopatológicas encontradas em <i>Notothenia rossii</i> . Fluorose induzida via entérica.....	40
Figura 19. Porcentagem de lesões histopatológicas encontradas em <i>Notothenia rossii</i> . Fluorose induzida via peritoneal.....	41
Figura 20. Porcentagem de lesões histopatológicas encontradas em <i>Notothenia corriceps</i> . Fluorose induzida via entérica.....	42
Figura 21. Porcentagem de lesões histopatológicas encontradas em <i>Notothenia corriceps</i> . Fluorose induzida via peritoneal.....	43
Figura 22. Porcentagem de alterações histopatológicas encontradas. Fluorose induzida via entérica. Comparação entre <i>Notothenia rossii</i> e <i>Notothenia corriceps</i>	44
Figura 23. Porcentagem de lesões histopatológicas encontradas. Fluorose induzida via peritoneal. Comparação entre <i>Notothenia rossii</i> e <i>Notothenia corriceps</i>	45

TABELAS

Tabela 1: Porcentagem de alterações histopatológicas de <i>Notothenia rossii</i> fluorose induzida via entérica.....	40
Tabela 2: Porcentagem de alterações histopatológicas <i>Notothenia rossii</i> , fluorose induzida via entérica.....	41
Tabela 3: Porcentagem de alterações histopatológicas de <i>Notothenia corriceps</i> , fluorose induzida via entérica.....	42
Tabela 4: Porcentagem de alterações histopatológicas de <i>Notothenia corriceps</i> , fluorose induzida via peritonal.....	43
Tabela 5. Teste do quiquadrado realizado com os animais de cada bioensaio. Fluorose induzida via entérica.....	46
Tabela 6. Teste do quiquadrado realizado com os animais de cada bioensaio. Fluorose induzida via peritoneal.....	46
Tabela 7. Teste do quiquadrado realizado entre com os animais controle e experimentais e controle de cada bioensaio realizado. Fluorose induzida via entérica.....	47
Tabela 8. Teste do quiquadrado realizado entre com os animais controle e experimentais e controle de cada bioensaio realizado. Fluorose induzida via peritoneal.....	47

“Estudo comparativo da ação do fluoreto na morfologia branquial de *Notothenia rossii* e *Notothenia coriiceps* sob estresse térmico e salino”

RESUMO

Devido a posição central do crustáceo *Euphausia superba*, o krill, na malha trófica do ambiente antártico, bem como o bioacúmulo de fluoreto no seu exoesqueleto e a biomagnificação desse íon no tecido ósseo dos animais Antárticos que dele se alimentam, sabe-se que todos os vertebrados Antárticos, direta ou indiretamente, estão expostos a uma sobrecarga de fluoreto. Esta fluorose desencadeia mecanismos moleculares, bioquímicos e morfológicos que podem, dependendo da magnitude, levar o animal à morte. Além disso, os registros climáticos dos últimos quarenta anos indicam um aumento de temperatura na Península Antártica. Este fato expõe os animais da região à alterações climáticas, principalmente relacionadas com alterações de salinidade, já que o degelo origina um grande volume de água doce no mar criando ambientes de baixa salinidade ou hiposmóticos, como é o caso da Baía do Almirantado onde localiza-se a Estação Antártica Comandante Ferraz (EACF). Diante disto, este trabalho tem por objetivo estudar comparativamente o efeito do fluoreto administrado via entérica (alimentação) e via peritoneal (injeção), sobre a estrutura branquial dos peixes Antárticos *N. rossii* e *N. coriiceps* frente ao aumento de temperatura e redução de salinidade. As atividades de campo foram desenvolvidas na EACF, localizada na Península de Keller, Baía do Almirantado, Ilha Rei George, Arquipélago das Ilhas Shetlands do Sul, Península Antártica. Após o período de aclimação, os peixes das duas espécies foram submetidos a diferentes condições experimentais durante 11 dias, em temperaturas de 0 e 4°C, salinidade de 35 e 20psu e fluoreto via entérica e peritoneal (15mg/Kg). Amostras do tecido branquial foram fixadas em ALFAC (álcool 80%, formaldeído e ácido acético glacial), para o processamento em microscopia de luz e em Karnovsky (paraformaldeído 2%, glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato 0,1M pH 7.2 a 4°C) para o processamento em microscopia eletrônica (transmissão e varredura). As amostras, dependendo a técnica utilizada, seguiram processamento padrão, já descritos na literatura. As alterações histopatológicas analisadas, em todas as situações experimentais, foram o descolamento e hipertrofia das células do epitélio respiratório, a hiperplasia do epitélio interlamelar, aneurisma, vacuolização e desestruturação das lamelas secundárias. As análises histológicas e ultraestruturais indicam que *N. rossii* e *N. coriiceps* possuem a estrutura branquial padrão descrita para outros peixes teleósteos. Alterações como a vacuolização e hipertrofia não foram observadas. Já, descolamento, hiperplasia, aneurisma e desestruturação das lamelas secundárias, foram as alterações histopatológicas observadas, em maior ou menor percentagem, dependendo da situação experimental. Maiores percentagens de ocorrência, geralmente, foram observadas em *N. rossii* quando comparada com *N. coriiceps*. A ocorrência de aneurismas é um exemplo deste fato. Em espécimes de *N. rossii* submetidos a 4°C e 20psu (via entérica) foi observado nos animais controle 42,85%

de aneurismas e nos experimentos a 4°C e 35psu os animais controle apresentaram 80% e os experimentais 40% de aneurismas. Já, em *N. coriiceps*, as maiores incidências foram 14,29% na situação experimental de 0°C e 20psu (via entérica) em animais controle e 28,57% na situação experimental de 0°C e 20psu (via peritonal) em animais experimentais. Descolamento do epitélio respiratório foi observado em todos os animais analisados. Já, a hiperplasia não foi observada em *N. coriiceps*, via peritonal, a 0°C em ambas as salinidades testadas (35psu e 20psu) e via entérica a 4°C e 20psu e 4°C e 35psu animais controle. Sob efeito do estresse térmico e salino a espécie *Notothenia coriiceps* apresentou mais histopatologias quando comparada à espécie *Notothenia rossii*. A administração de fluoreto via entérica ou peritonal, não influenciou o surgimento das patologias observadas neste trabalho.

Palavras-chaves: Antártica; Notothenídeos; Histopatologia; Salinidade; Fluoreto.

1. Introdução

A ictiofauna antártica está exposta a fortes restrições ambientais e certamente sua sobrevivência na região polar depende das várias adaptações sofridas ao longo do processo evolutivo (Eastman e Eakin, 2000; Eastman, 2005; di Prisco, 2006). Os peixes são organismos muito importantes na descrição de alterações fisiológicas em resposta à alterações ambientais, por apresentarem alguns processos fisiológicos básicos semelhantes a outros organismos e por possuírem o corpo submerso em água, permitindo seu contato direto com o ambiente, tornando-os sensíveis bioindicadores (di Prisco, 2006).

Dentre os vários fatores abióticos presentes no ambiente marinho, a salinidade é um dos fatores que exerce grande pressão seletiva sobre os organismos (Varsamos, *et al.*, 2005). Interfere em processos como a fertilização, a incubação de ovos, o crescimento larval (Boeuf, 2001) e o desenvolvimento dos peixes através da ação hormonal, pois alguns hormônios fundamentais na osmorregulação, também controlam a frequência de ingestão de alimentos e o crescimento do animal (Sakamoto, 2006).

Outro fator que limita a sobrevivência dos organismos antárticos é a temperatura. Recentemente, estudos sobre o aquecimento e alterações climáticas indicam que a Península Antártica (Clarke *et al.*, 2007), em especial nos últimos 40 anos, no litoral da Ilha Rei George (Barnes *et al.*, 2006), é uma das três regiões do planeta que está sofrendo acelerado aquecimento quando comparados ao restante do globo. Os resultados desse aquecimento podem ser detectados na retração das geleiras, no colapso das plataformas de gelo e na exposição de habitats que antes ficavam cobertos de gelo (Clarke *et al.*, 2007). Esse fato, unido à formação de fiordes e retração das geleiras (significando grande volume de água doce no mar), podem indicar a formação de microhabitats marinhos com salinidade reduzida. Isso explica a necessidade de estudos com a fauna marinha sob variações de salinidade e de temperatura.

Assim como outros peixes antárticos o gênero *Notothernia* é um importante elo da cadeia trófica antártica, conectando níveis inferiores à níveis superiores (La Mesa *et al.*, 2004). Servem de alimento para vários predadores como outros peixes, focas e aves, mas possuem também uma dieta bastante variada, alimentando-se de algas,

poliquetas, anfípodas, gastrópodes, bivalves e o *krill* Antártico. Sendo o último consumido preferencialmente no final da primavera e início do verão (Fanta et al., 2003, La Mesa et al., 2006; Barrera-Oro & Piacentino, 2006, Smith et al., 2007). O *krill* Antártico apresenta bioacúmulo de fluoreto em seu exoesqueleto (Sands et al., 1998; Camargo, 2003). Assim, os animais antárticos estão sujeitos à um consumo elevado de fluoreto e para evitar a fluorose em tecidos moles, os animais que consomem esse crustáceo apresentam o processo de biomagnificação desse íon em seu tecido ósseo (Camargo, 2003).

A intoxicação por níveis altos de fluoreto pode levar ao aparecimento de vários sintomas antes da morte, como: hipoexcitabilidade, velocidade respiratória reduzida, letargia e comportamento apático (Camargo, 2003). Várias pesquisas já mostraram alterações a níveis moleculares em peixes antárticos devido à fluorose (Bacila et al., 1989; Wang et al., 2000; Camargo 2003). Bhatnagar (2007) demonstrou que teleósteos de água doce submetidos à fluorose desenvolveram no tecido branquial, alterações como hiperplasia lamelar, edema, metaplasia, telangiectasia lamelar. Houve também, modificação na estrutura de células pilares das brânquias devido ao aumento de células de cloreto.

As brânquias são órgãos fundamentais para manter a homeostase corpórea de peixes teleósteos, principalmente em ambientes marinhos. Dentre as várias funções, podemos citar: trocas gasosas, regulação osmótica e iônica, regulação ácido-base e excreção de nitrogênio (Evans et al., 2005). Através das brânquias passa um fluxo unidirecional de água, ou seja, o epitélio respiratório presente neste órgão, está diretamente em contato com o ambiente (Knut Schmidt-Nielsen, 1996; Pough et al., 2003). A estrutura básica das brânquias baseia-se em um sistema de subdivisões sucessivas, e as trocas gasosas ocorrem nas menores unidades, as lamelas secundárias ou lamelas respiratórias. A vascularização branquial possui um arranjo cujo objetivo é maximizar as trocas gasosas (Schmidt, 1996; Pough et al., 2003). O epitélio branquial dos peixes é caracterizado por ser extremamente sensível, metabolicamente ativo e altamente dinâmico (Rankin et al., 1982, Hinton et al., 1992, Poleksic e Mitrovic-Tutundzic, 1994).

Considerando o registro do aumento da temperatura na Península Antártica, a constante ingestão de fluoreto por animais da região e o alto grau de sensibilidade do epitélio branquial, propõe-se nesse trabalho submeter as espécies endêmicas *Notothenia rossi* e *Notothenia corriceps* à diferentes condições experimentais de

temperatura e salinidade e verificar se há danos na estrutura branquial dessas espécies, e compará-las.

2. Revisão Bibliográfica:

De acordo com a Teoria da Deriva continental de Alfred Wegener, a plataforma Continental Antártica fazia parte do supercontinente Gondwana, até o final do Período Cretáceo. Devido a sua posição, a Antártica possuía, nessa época, climas amenos, águas mais quentes e com maior diversidade de vida (Eastman, 1993). Registros fósseis de peixes de água doce foram encontrados na Antártica e mostram afinidades biogeográficas com formas da Austrália, comprovando essa hipótese (Eastman, 1991). Quando o supercontinente Gondwana iniciou sua fragmentação (190 a 135 milhões de anos atrás), o Continente Antártico, iniciou sua derivação para a posição polar atual, tornando-se isolado dos outros continentes (Fig.1). Foi nessa época também que a Península Antártica teve sua formação iniciada. Já, as ilhas subantárticas, teriam emergido de maneira gradual do oceano (Eicher, 1982).

Quando a Passagem de Drake se abriu (a aproximadamente 30 a 14 milhões de anos), formou-se o Oceano Circum-Antártico ou Oceano Austral, que corresponde aproximadamente a 10% da superfície dos oceanos do planeta (Eastman, 2005). Mas, o isolamento antártico decorre principalmente da Convergência Antártica caracterizada por uma frente oceânica bem definida, originada pelo estabelecimento de correntes oceânicas circumpolares, que criaram uma frente oceânica tempestuosa e bem definida, isolando a Antártica climática e biologicamente (di Prisco *et al*, 1991).

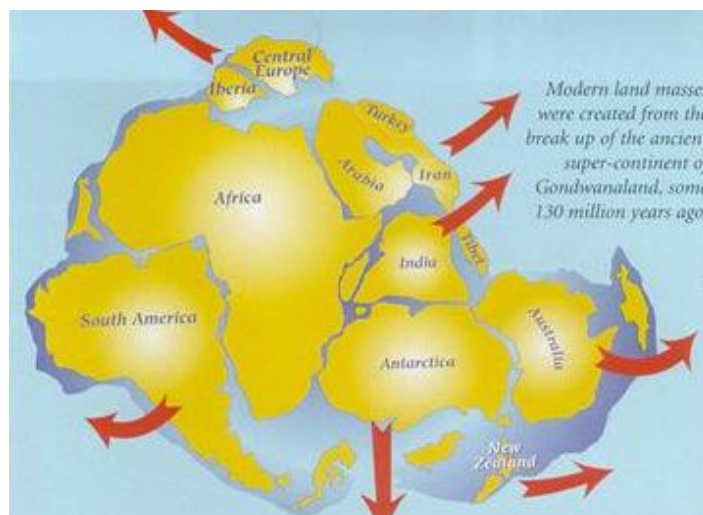


Figura 1- Posição da Antártica no supercontinente Gondwana. A flecha indica a direção para a qual os continentes se direcionaram. (www.abagrp.cnpm.embrapa.br).

Atualmente a Antártica, está localizada abaixo do paralelo 60°S, situada à aproximadamente 550 milhas marítimas do sul da América do Sul, ocupando uma posição quase que concêntrica em torno do Pólo Sul, sendo o quinto e mais austral dos continentes (Bellisio & Tomo, 1974, Schuch,1997). O Continente Antártico representa quase 10% da área continental do planeta, totalizando 14 milhões de quilômetros quadrados (Bellisio & Tomo, 1974). Teve seu resfriamento, acontecendo de maneira gradual durante 20 milhões de anos, alcançando a temperatura de 0°C entre 3 e 5 milhões de anos atrás (Johnston *et al.*,1991). Cerca de 98% de suas terras estão cobertas de gelo e neve, durante o ano todo, com uma espessura que varia de 2.000 a 4.800 metros. A neve acumulada há milênios, tem afundado o continente e a plataforma continental em vários mil metros, de forma que, uma considerável porção de terra da Antártica encontra-se abaixo do nível do mar. Entretanto, existem montanhas que se projetam até 2.000 metros acima da superfície de gelo (Eastman, 1993). No inverno, pelo congelamento dos mares em sua volta, a área do Continente Antártico aumenta para 32 milhões de quilômetros quadrados, devido à formação de um cinturão de cerca de 1.000 quilômetros de largura (Schuch,1997). Nos meses de verão, esse recua praticamente até o litoral com exceção dos mares de Weddel e Ross (Sidell, 2000). As temperaturas médias anuais variam de 0°C (verão) a -15°C (inverno) no litoral e de -32° (verão) a -65°C (inverno) no interior do continente (Schuch,1997).

O Continente Antártico é cercado pelo Oceano Circum-Antártico ou Oceano Austral (Sidell, 2000). Este oceano é constituído da porção sul dos oceanos Atlântico, Pacífico e Índico, e possui de 3.000 a 5.000 metros de profundidade. É

caracterizado por um sistema circumpolar de correntes e frentes hidrográficas, que influenciam diretamente a vida dos organismos polares que ali vivem (Ekau, 1991). Entre os paralelos 50° e 60°S, existe uma barreira natural, a Convergência Antártica, que isola e separa o Oceano Austral dos oceanos que o formam. Esta Zona de Convergência estabeleceu-se à 30 milhões de anos atrás e afeta diretamente as condições locais de clima (di Prisco *et al.*, 1991) (Fig. 2).

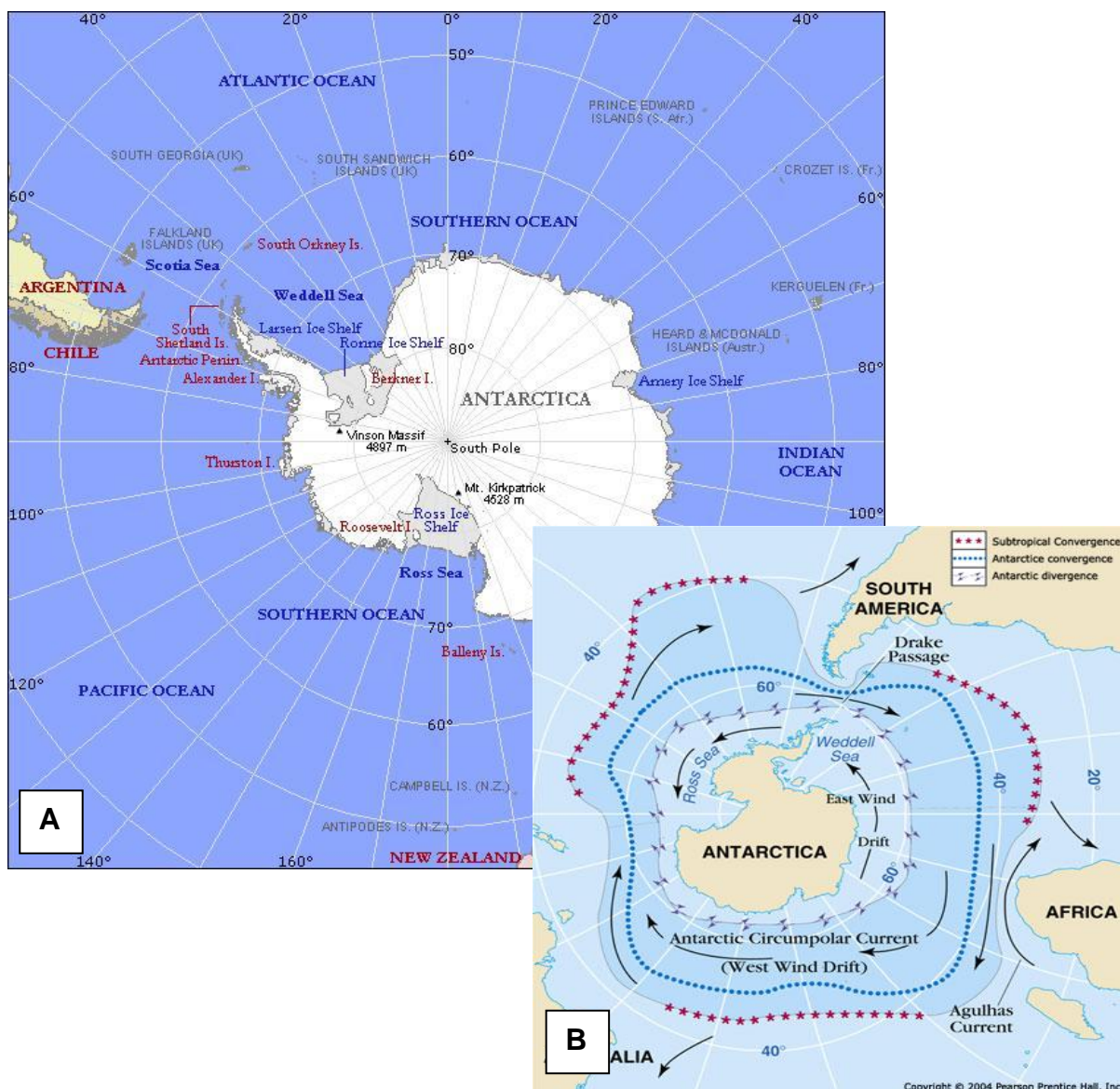


Figura 2. Continente Antártico cercado pelo Oceano Austral (A), delimitado pelo paralelo 60° Sul e pela Convergência Antártica (B). (Fonte: <http://sarracena.blogspot.com> (A) e <http://polardiscovery.who.edu/antarctica/circulation-en.html> (B)).

O Oceano Antártico é de grande importância, pois é o principal meio pelo qual ocorrem trocas de energia, calor e massa entre as três bacias oceânicas. Essas

trocas podem representar papel significativo no controle do clima mundial (Pereira *et al.* 2004). Massas d'água formadas na Antártica se deslocam, ventilando outros oceanos e influenciando o clima e a riqueza das águas costeiras que banham os continentes. Outro papel importante desse Oceano é a troca de CO₂ entre a água e a atmosfera (Ekau, 1991).

A temperatura do mar nas áreas próximas ao continente nunca varia, permanecendo constantemente em -1,9°C e nas regiões mais ao nordeste a 2°C. Na Península Antártica e nas ilhas subantárticas a temperatura pode variar de +1,5°C no verão até -1,8°C no inverno (Sidell, 2000).

O regime de luz na Antártica é bem característico de regiões polares. No inverno há longos períodos sem luz enquanto que no verão a luz é praticamente constante. Já, na primavera e no outono as condições são intermediárias (Rivkin e Putt, 1987). A penetração de luz no mar pode ser influenciada por diversos fatores, dentre os quais, a presença de gelo e de neve. A luz pode ser atenuada pelas comunidades microbianas deste ambiente. Além disso, a sazonalidade está diretamente relacionada à produção primária e biomassa. Por exemplo, no inverno a camada trófica sofre alterações principalmente na base da cadeia trófica, acarretando uma diminuição da biomassa (Donatti, 2002).

A radiação solar também afeta a salinidade da água. Durante os meses de inverno o oceano ao redor do continente congela devido à ausência de luz solar. Com a formação do gelo muitos sais dissolvidos na água do mar são excluídos, aumentando a salinidade e, conseqüentemente, a densidade da água tornando-a até duas vezes mais viscosas que a água dos mares temperados (Eastman, 1991)

Todas as características listadas acima, certamente tiveram influência sobre as adaptações evolutivas da fauna marinha principalmente no que se refere a flutuabilidade, natação, percepção sensorial, ventilação branquial e filtração alimentar (Eastman, 1993; Donatti *et al.*, 2008). Mas a adaptação mais singular dos peixes antárticos é a síntese de glicoproteínas anticongelantes. Essas moléculas são liberadas no sangue e em fluidos teciduais e suas propriedades reduzem o ponto de congelamento sem afetar o ponto de fusão. Assim, possibilitam aos organismos antárticos a sobrevivência em baixas temperaturas (Giese *et al.*, 2000 e Knut Schmidt-Nielsen, 1996).

Além da presença das glicoproteínas anticongelantes os peixes antárticos possuem um comportamento conhecido como adaptação metabólica ao frio, isto é,

eles apresentam metabolismo relativamente baixo, mas as taxas metabólicas são mais altas do que o esperado caso fosse feita uma projeção do metabolismo de peixes temperados em temperaturas próximas a 0°C (Johnston *et al.*, 1991). Estudos indicam que algumas enzimas de peixes antárticos são muito mais ativas em temperatura baixas quando comparadas às enzimas de peixes de águas mais quentes (Macdonald *et al.*, 1987). Entretanto, sabe-se que esses animais, apresentam baixa tolerância à variações de temperatura. Como são animais extremamente adaptados, qualquer variação em seu habitat pode ser determinante para interromper seu desenvolvimento (Portner, 2006).

A ictiofauna antártica apresenta alto grau de endemismo, sendo exclusivamente marinha e correspondendo à 1% das espécies de peixes do mundo, o que caracteriza uma baixa diversidade (Eastman, 1993). Um dos motivos dessa escassez pode ser o regime de luz, que é o principal fator limitante para a disponibilidade de alimento (Fisher e Hureau, 1988).

A Subordem Notothenoidei, predominante na região, está representada por oito famílias, 44 gêneros e 129 espécies, sendo que destas 101 são exclusivamente antárticas (Eastman, 2005). Isso significa aproximadamente 50% das espécies conhecidas na região Austral, sendo a família Notothenidae a mais abundante (Eastman, 2005). Estudos sugerem que esse grupo é monofilético, surgindo de um “vácuo ecológico”, e que a fauna anterior teria sido totalmente extinta (Eastman, 1993). A grande maioria das espécies da família Notothenidae é sedentária demersal, mas algumas teriam se adaptado a viver no ambiente pelágico, e outras associadas ao gelo na superfície (DeVries, 1988). Caracterizados pela diversidade morfológica, os nototeniídeos adaptaram-se muito bem às condições do Oceano Antártico. Apesar de não estar claro o porquê dos nototeniídeos terem se adaptado melhor à Antártica que outros grupos, há uma hipótese de que a tolerância desse grupo às águas profundas propiciou refúgio durante a glaciação (Eastman, 1989; Ekau, 1991)

Pertencem à família Notothenidae as espécies *Notothenia rossii* e *Notothenia coriiceps*. Ambas são amplamente distribuídas, sendo encontradas nas regiões antárticas e subantárticas, assim como nas águas costeiras da Nova Zelândia e América do Sul, (Eastman, 1993). Representam duas das quatro espécies mais abundantes na Baía do Almirantado, local onde o presente estudo foi realizado, e são endêmicos da região antártica (Casaux *et al.*, 1990; Barnes *et al.*, 2006). São

encontradas em profundidades entre 0 e 550 metros (Kock, 1992; Gon e Heemstra, 1991). Esses peixes não possuem bexiga natatória, e são normalmente mais densos que a água, assim alimentam-se e desovam próximo ao substrato (Kock, 1985b, 1992).

De maneira geral, *Notothenia rossii*, *Notothenia coriiceps* e as outras espécies de nototenídeos são caracterizadas, pela forma caudal e o comprimento do intestino, como carnívoros de natação lenta (Ojeda, 1986; Ekau, 1991). Entretanto estudos revelam que os hábitos alimentares de *Notothenia rossii*, podem variar de acordo com o estágio de desenvolvimento. Estágios mais jovens (pós-larva) alimentam-se principalmente de larvas de grandes crustáceos. Pequenos juvenis costeiros alimentam-se de copépodos planctônicos, anfípodos e larvas de peixes e de decápodos. Juvenis maiores alimentam-se principalmente de peixes, algas e outros grupos demersais como poliquetas, gastrópodes e decápodos (Hureau, 1970; Tarverdiyeva, 1972). As algas são um alimento regular e não são ingeridas acidentalmente (Bellisio, 1964; Burchett, 1983 *apud* Knox, 1994).

Notothenia rossii apresenta cabeça e corpo levemente comprimidos lateralmente, boca oblíqua e possui duas nadadeiras dorsais. Os adultos possuem coloração marrom clara, sendo o dorso a parte mais escura e com pontos negros distintos ao longo do corpo. Já, os juvenis possuem diferentes padrões de coloração, que variam de amarelo a marrom ou laranja (Fisher e Hureau, 1985). (Fig.3)



Figura 3. Fotografia de *Notothenia rossii* coletada no momento da pesca na Baía do Almirantado. (Foto: Beatriz Bove da Costa Boucinhas).

A espécie *Notothenia coriiceps* é caracterizada como onívora com amplo espectro trófico, e seus hábitos alimentares podem variar de acordo com a

profundidade. Em águas rasas (até 20 metros de profundidade) a espécie consome preferencialmente animais bentônicos, ou seja, anfípodos, gastrópodes e bivalves (Richardson, 197; Knox, 1994). Já em profundidades superiores a 170 metros a dieta é composta preferencialmente de animais pelágicos, como peixes menores, anfípodos hiperrídeos e *krill* antártico (*Euphasia superba*) (Permitin & Tardiyera, 1978; Knox, 1994). Segundo Knox (1994), à medida que o animal cresce o número de espécies e a quantidade de presas consumidas pode aumentar.

Adultos de *Notothenia coriiceps* possuem corpo largo, cabeça grande e levemente deprimida. A coloração do corpo aproxima-se do marrom escuro com manchas marrom claras, pretas ou esverdeadas, o abdome é amarelo claro, tornando-se amarelo-esverdeado com a idade (Fisher e Hureau, 1985). (Fig. 4).

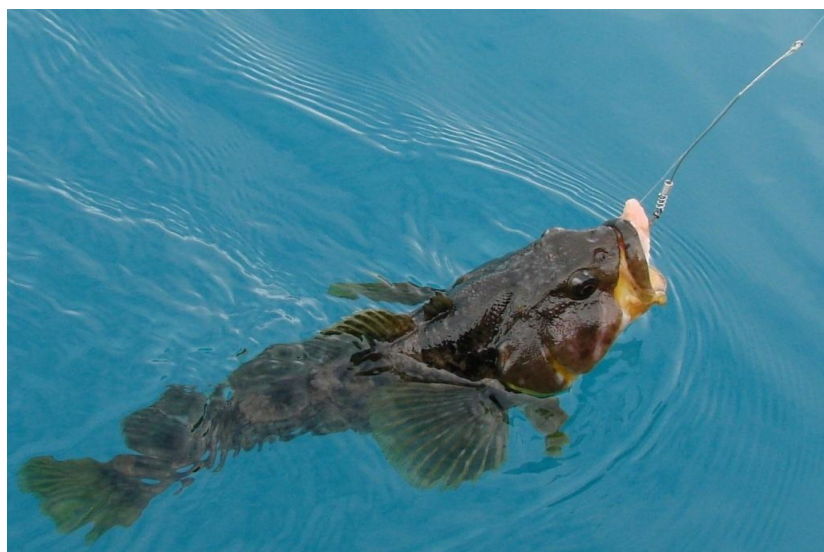


Figura 4: Fotografia de *Notothenia coriiceps*, coletada no momento da pesca na Baía do Almirantado. (Foto: Beatriz Bove da Costa Boucinhas)

É importante ressaltar que estudos mais detalhados sobre os hábitos alimentares de *Notothenia rossii* e *Notothenia coriiceps* revelaram que esses animais alimentam-se preferencialmente de *krill* Antártico (*Euphausia superba* Dana), principalmente no final da primavera e no verão (Barrera-Oro, 1990).

O *krill* Antártico possui uma posição central na malha trófica do ecossistema Antártico. Esse crustáceo possui como característica marcante, concentrações elevadas de fluoreto em seu exoesqueleto (Nicol & De La Maré, 1993). Assim todos os animais estão sujeitos direta ou indiretamente à uma sobrecarga de fluoreto, que normalmente acumula-se no tecido ósseo dos vertebrados Antárticos (Aldelug *et. al.*, 1985; Stands *et. al.*, 1998; Camargo, 2003). Alguns estudos indicaram que no

caso de pingüins Adélia (*Pygoscelis adeliae*), o fluoreto é tamponado pelo tecido ósseo e apresenta meia vida de 3 a 4 semanas sendo excretado essencialmente pela cloaca. É possível dizer que a concentração de equilíbrio do fluoreto no osso dessa ave é de aproximadamente 10.000 mgF⁻/Kg d.w. (Culick, 1987). Estudos com peixes antárticos da Ilha Elefante revelaram valores elevados de fluoreto no tecido ósseo em *Gobionotothen gibberifrons* (1.156 µgF⁻/g de peso seco), em *Micromesistius australis* (1.207 µgF⁻/g de peso seco) e no *Chaenocephalus aceratus* (1.143 µgF⁻/g de peso seco), quando comparado a peixes teleósteos marinhos de outras regiões (45 à 940 µgF⁻/g de peso seco) (Oehlenschläger e Manthey, 1982). Acredita-se que esse tamponamento do fluoreto pelo tecido ósseo é um mecanismo de defesa para evitar o acúmulo de fluoreto nos tecidos moles do animal (Culick, 1987).

A preocupação com o fluoreto deve-se a ação tóxica desse íon na inibição enzimática (fosfatases, hexoquinase, arginase, enolase, succinato desidrogenase, dentre outras enzimas), e conseqüentemente na redução de atividade das vias metabólicas vitais, principalmente envolvendo o metabolismo energético e a síntese de proteínas (Pethe *et al*, 2002; Camargo, 2003). Estudos sobre a fluorose em tecido hepático do peixe *Takifugo rubripes*, revelou que há redução na expressão de 35 proteínas e elevação na síntese de outras 16. Essa alteração pode estar relacionada com o estresse induzido pelo fluoreto sobre o retículo endoplasmático (Lu *et al.*, 2010). Esse teria relação com danos a nível de DNA podendo levar a célula à apoptose por fluorose (Giancarlo, 2006).

Para *Notothenia coriiceps*, foi descrito que a fluorose é também inibidora enzimática, prejudicial ao metabolismo da glicose e à síntese de proteínas. E pode também alterar a composição de ácidos graxos insaturados, de lipídeos estruturais e de reserva. Também a enolase dessa espécie é mais sensível à fluorose, sendo inibida com mais facilidade quando comparada a do pinguim papua e a do *krill* Antártico (Wang *et al.*, 2000).

A fluorose pode ainda aumentar a atividade de sistemas antioxidantes, pois sua toxicidade pode acelerar a formação de radicais livres, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e peroxidação de lipídeos (Zhang *et al.*, 2007; Lu, *et al.*, 2010). Acredita-se que a toxicidade do fluoreto pode acarretar mau funcionamento do

retículo endoplasmático, interferindo na síntese de proteínas (Sharma *et al.*, 2008), causando alterações morfológicas e neoplásicas (Tsutsui *et al.*, 1984).

Para determinar os efeitos tóxicos de agentes químicos em tecidos e órgãos, diversos métodos podem ser utilizados, mas uma maneira rápida e eficaz é a análise histopatológica, pois permite a observação de alterações morfológicas em resposta ao estresse (Johnson *et al.*, 1993). Normalmente o fígado e as brânquias são analisados. O fígado por ter papel fundamental no metabolismo dos animais (Jobling & Sumpter, 1993) e as brânquias por possuírem grande superfície de contato e estarem diretamente relacionadas à resistência contra patógenos e substâncias tóxicas, além do contato direto com o ambiente (Shephard, 1994).

Os peixes teleósteos possuem quatro pares de arcos branquiais (Fig. 5), localizados no interior da cavidade faríngea, que são sustentados por um esqueleto ósseo e atuam como suporte para estruturas denominadas lamelas primárias ou filamentos (Randall *et al.*, 2000). Estendem-se de ambos os lados de cada lamela primária as lamelas secundárias que consistem de estruturas semicirculares, compostas essencialmente de camadas finas de células epiteliais separadas por células pilares, formando assim o epitélio respiratório, onde ocorrem efetivamente as trocas gasosas (Laurent, 1982; Ferguson, 1995). Essas estruturas formam um sistema de subdivisões sucessivas e estão dispostas dessa maneira a fim de aumentar a superfície de contato (Fig. 6).



Figura 5. Fotografia da vista lateral de *Notothenia coriiceps*, mostrando as fendas e os quatro arcos branquiais na cavidade opercular (Adaptado de: Rios, 1997).

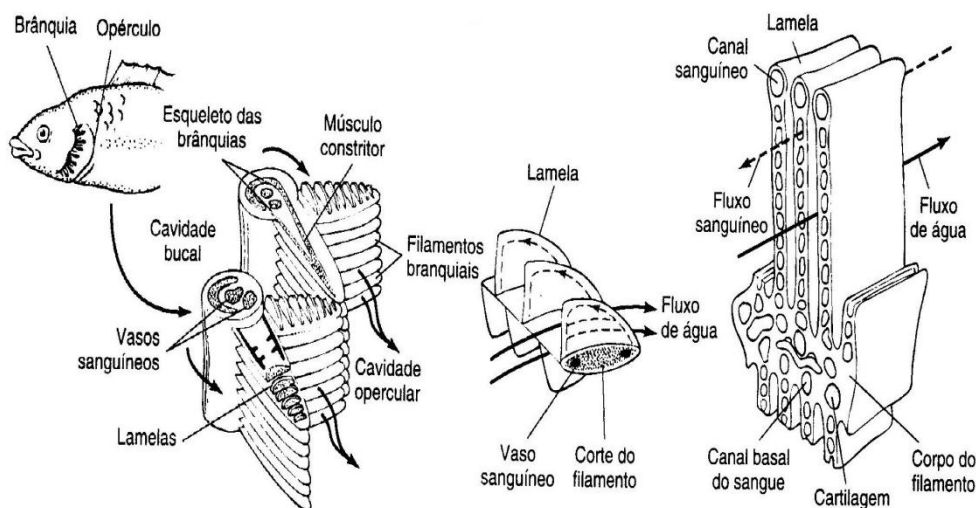


Fig. 6: Representação das brânquias de peixes teleósteos em aumentos crescentes. As setas pretas contínuas indicam o fluxo de água; setas e linhas tracejadas indicam o fluxo de sangue. (Fonte:Knut Schmidt-Nielsen, 1996).

Além das células pilares, vários tipos celulares compõem o epitélio branquial, em particular, células pavimentosas de revestimento, células de cloreto e células produtoras de muco (Monteiro, 2004). As células pilares delimitam os espaços sanguíneos, por onde flui o sangue, com seus prolongamentos (Ferguson, 1995). As células pavimentosas são freqüentes nos espaços interlamelares, no epitélio das lamelas, representando normalmente 95% do epitélio branquial.

Estão ligadas às células pavimentosas, por meio de junções ocludentes e desmossomos, as células de cloreto descritas pela primeira vez por Keys e Wilmer em 1932. Essas células são ricas em mitocôndrias e possuem a função de excretar cloreto. Geralmente ocupam uma pequena porção da superfície epitelial exposta e encontram-se normalmente nas regiões inter-lamelares (Perry *et al.*, 1996; Parvez *et al.*, 2005).

As células produtoras de muco podem ser encontradas em número elevado nas brânquias. Essas células sintetizam e secretam mucina, uma glicoproteína que é o principal componente orgânico do muco. A principal função dessas células é criar uma camada de muco que, combinada com a água imediatamente em contato com o epitélio branquial, fornece um microambiente que pode apresentar condições

bastante diferentes do ambiente externo. Acredita-se que esse microambiente ajude na proteção contra patógenos. Além de impedir que microorganismos estranhos se fixem, o muco possui a capacidade de coagulação e precipitação de partículas em suspensão (Monteiro, 2004).

As lamelas secundárias são de fato as estruturas responsáveis pela respiração. A absorção de oxigênio é potencializada tanto por essa subdivisão como pela direção da corrente sanguínea, que é oposta à do fluxo da água, formando um sistema de contracorrente (Hughes, 1984). Assim o gradiente de difusão através das brânquias é constante, permitindo que o oxigênio seja absorvido e o dióxido de carbono eliminado (Knut Schmidt-Nielsen, 1996).

As brânquias desenvolvem diversas funções nos peixes, sendo estruturas vitais. Estão envolvidas nos mecanismos de respiração e excreção (Evans et al., 2005). Além do controle do estresse osmótico, principalmente em peixes teleósteos (Randal, et. al., 2000).

Notothenia rossii e *Notothenia coriiceps* são peixes marinhos, e estão em constante risco de perder a água do corpo para o ambiente, pois são hiposmóticos em relação à água do mar (Mazeaud e Mazeaud, 1981). Para compensar essa inevitável perda de água por osmose, os peixes marinhos ingerem água constantemente (McCormick, 1995; Shimidt e Nielsen, 1996; Randal et al., 2000; Pough et al., 2003). No entanto, ao recuperar o conteúdo hídrico pela ingestão de água, grande quantidade de sal acabam sendo absorvidas, e o organismo precisa eliminar o excesso de sal. Para que o ganho fluido seja eficiente, o sal deve ser excretado em concentrações superiores à da água do mar. Como o rim de peixes teleósteos, que é o caso de *Notothenia rossii* e *Notothenia coriiceps*, não consegue produzir uma urina mais concentrada que o sangue, as brânquias são responsáveis por fazer essa excreção, participando assim ativamente da regulação osmótica (Randal, et al., 2000 e Knut Schmidt-Nielsen, 1996).

3. Objetivos

3.1 Geral:

Avaliar, sob o aspecto histopatológico e ultraestrutural, a ação do fluoreto na estrutura branquial de *Notothenia rossii* e *Notothenia coriiceps* sob estresse térmico e hiposmótico.

3.2 Específicos:

- Caracterizar, através de microscopia de luz e microscopia eletrônica, a estrutura histológica padrão das brânquias dos peixes antárticos *Notothenia rossii* e *Notothenia coriiceps*.
- Determinar, através de microscopia de luz e microscopia eletrônica, a ação do fluoteto, via peritonal, na estrutura branquial de *Notothenia rossii* e *Notothenia coriiceps* sob estresse térmico e salino.
- Determinar, através de microscopia de luz e microscopia eletrônica, a ação do fluoteto, via entérico, na estrutura branquial de *Notothenia rossii* e *Notothenia coriiceps* sob estresse térmico e salino.
- Comparar, sob o aspecto histológico e ultraestrutural, a ação do efeito do fluoreto, via entérico e via peritoneal, na estrutura branquial de *Notothenia rossii* e *Notothenia coriiceps* sob estresse térmico e salino.

4. Material e Métodos

4.1. Área de Estudo

Os bioensaios descritos neste trabalho foram realizados na Estação Antártica Comandante Ferraz (EACF) localizada na Baía do Almirantado, no setor central da ilha Rei George, Arquipélago das Shetlands do Sul, na Península Antártica (Kern, 2008 *apud* Rakusa-Suszczewski, 1995). (Fig. 7).

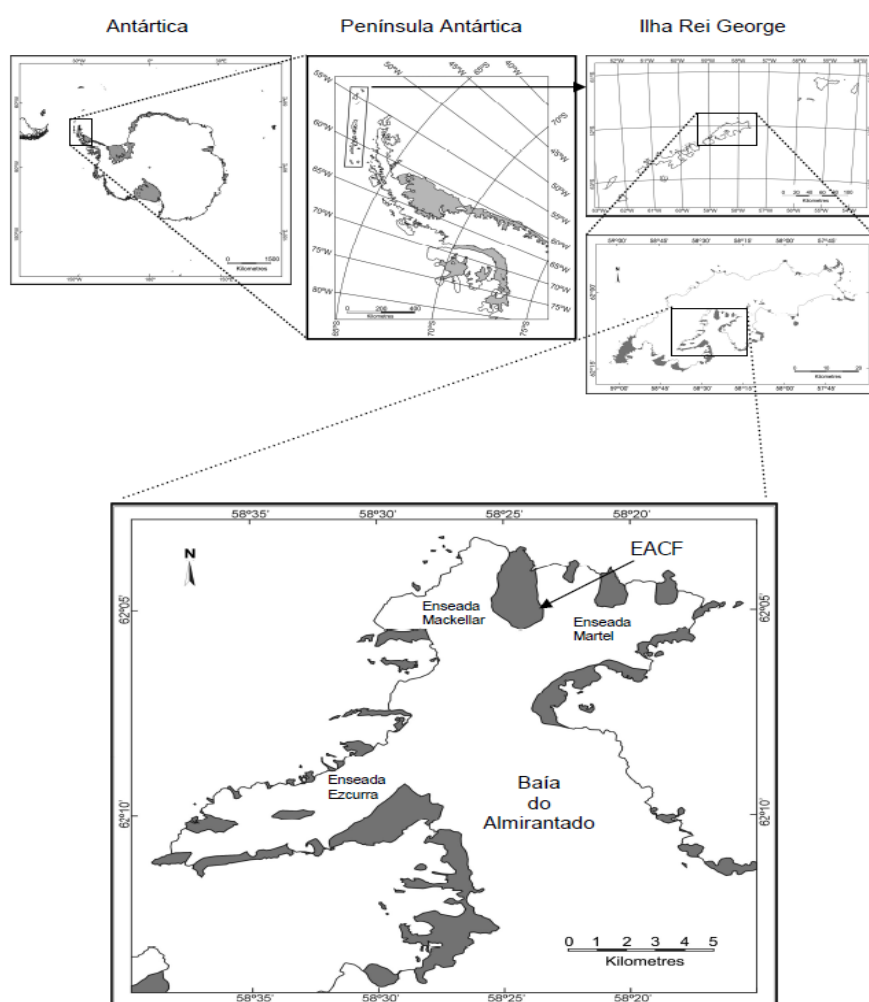


Figura 7: Localização da Estação Antártica Comandante Ferraz (Fonte: Simões, 2004).

A Ilha Rei George, está situada entre as coordenadas 61°50' – 62°15'S e 57°30' – 59°00'W (Bintanja, 1995), possui uma área total de 1.300 quilômetros quadrados e aproximadamente 90% de sua superfície está coberta de gelo. É a maior ilha do Arquipélago das Shetlands do Sul, um conjunto de 62 ilhas e 52 rochedos localizados a oeste da Península Antártica (Rakusa-Suszczewski, 1993). A

passagem de sucessivos sistemas ciclônicos determina o clima da Ilha, pois transportam ar aquecido e úmido, fortes ventos e grande volume de precipitação (Bintanja, 1995).

A Baía do Almirantado é um vale pós-glacial aberto para o Estreito de Bransfield no lado sul da Ilha de Rei George (Rakusa-Suszczewski, 1993). Ao norte estão localizadas três enseadas: Ezcurra, Mackellar e Martel (Pruszek, 1980). A costa litorânea se estende desde Demay Point até Punta Martins, totalizando uma extensão de 91 quilômetros, com cerca de 85,5% da área total coberta de gelo (Rakusa-Suszczewski, 1993). Possui uma área superficial de 122,08 quilômetros quadrados e profundidade máxima de 530-540 metros (Rios, 1997), totalizando um volume de água de 24 quilômetros cúbicos. É a maior das baías da Ilha Rei George (Rakusa-Suszczewski, 1980). Está localizada na latitude 62°05'S e 58°23'W, 750 km a sudeste da América do Sul e constitui uma área de grande interesse ambiental e científico (Rakusa-Suszczewski, 1993). A temperatura média anual varia de -1,7 a -2,0°C na superfície, de -1,1 a +0,28 a 400 metros de profundidade e na coluna d'água é de +0,4°C em média (Kulenz, 1994). O fundo da parte central da baía é lodoso e inclinado, com a presença de muitas morainas e cumes que correspondem aos períodos de máxima glaciação. Quando observada em corte transversal tem formato de U (Pruszek, 1980).

4.2. Coleta

Os espécimes de *Notothenia rossii* e *Notothenia coriiceps*, coletados na Baía do Almirantado pesavam entre 300 a 600 gramas. Para a captura dos animais foi utilizado linha e anzol (Fig. 8-B) e os pontos de coleta foram Punta Plaza e Glaciar *Ecology* (Fig. 9), entre 10 a 20 metros de profundidade. Os peixes foram transportados dos locais de coleta para os aquários da EACF e mantidos sob condições controladas de temperatura, salinidade e aeração. A pesca foi conduzida a bordo de botes pneumáticos do tipo “Zodiac” (Fig. 8-A) e os peixes acondicionados em caixas plásticas, sendo a troca de água realizada manualmente durante o percurso.

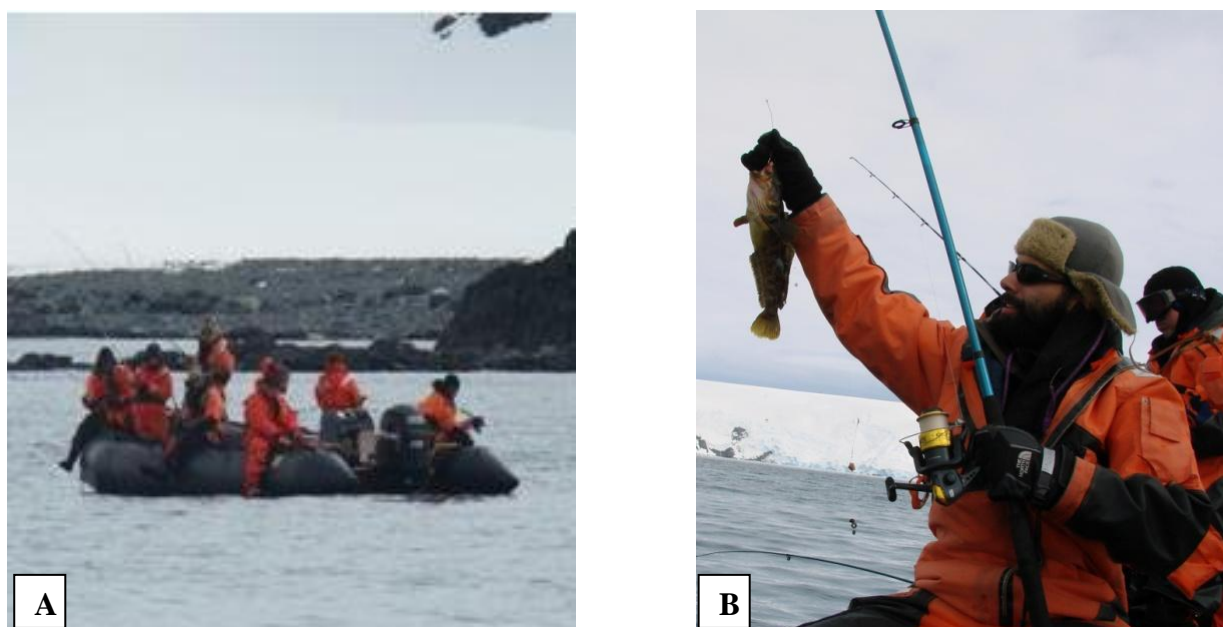


Figura 8. (A):Fotografia dos botes pneumáticos do tipo “Zodiac” utilizados nas saídas de campo e (B) Captura realizada com linha e anzol. (Fotos: Beatriz Bove da Costa Boucinhas).

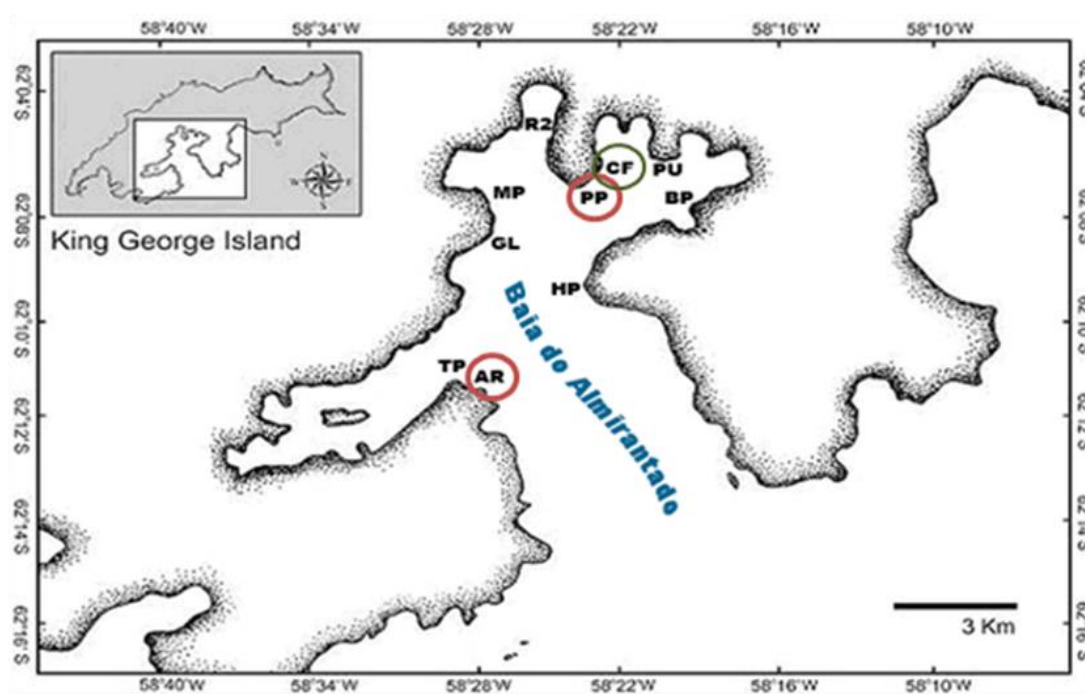


Figura. 9: Mapa da Baía do Almirantado indicando os locais de coleta: PP- Punta Plaza; AR: Glaciar Ecology; CF: Estação Antártica Comandante Ferraz (Fonte: Edson Rodrigues Júnior).

4.3. Arranjo Experimental

Os bioensaios foram conduzidos em salas contendo tanques com temperatura controlada, nas dependências da EACF, no período de novembro de 2009 a fevereiro de 2010. A água do mar foi captada a uma profundidade de 4 metros, em frente a EACF, e bombeada para os aquários. A densidade foi aproximadamente um peixe por 0,150 m³.

Os animais foram alocados em aquários de 1000L (Fig. 10-A, B), por um período de 3 dias para aclimação, em condições próximas as da natureza (salinidade: 35psu e temperatura: 0°C). Os aquários foram limpos a cada dois dias e 50% da água trocada. Todos os experimentos foram realizados com no máximo 6 peixes/ aquário, utilizando um total de 16 peixes/ experimento.

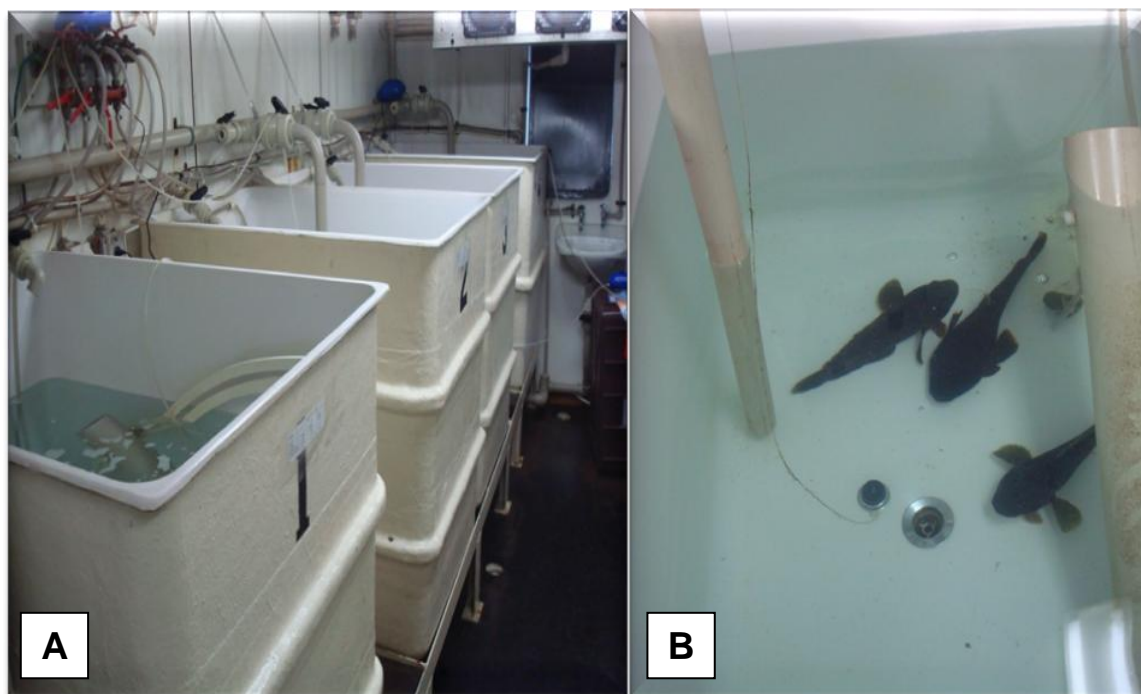
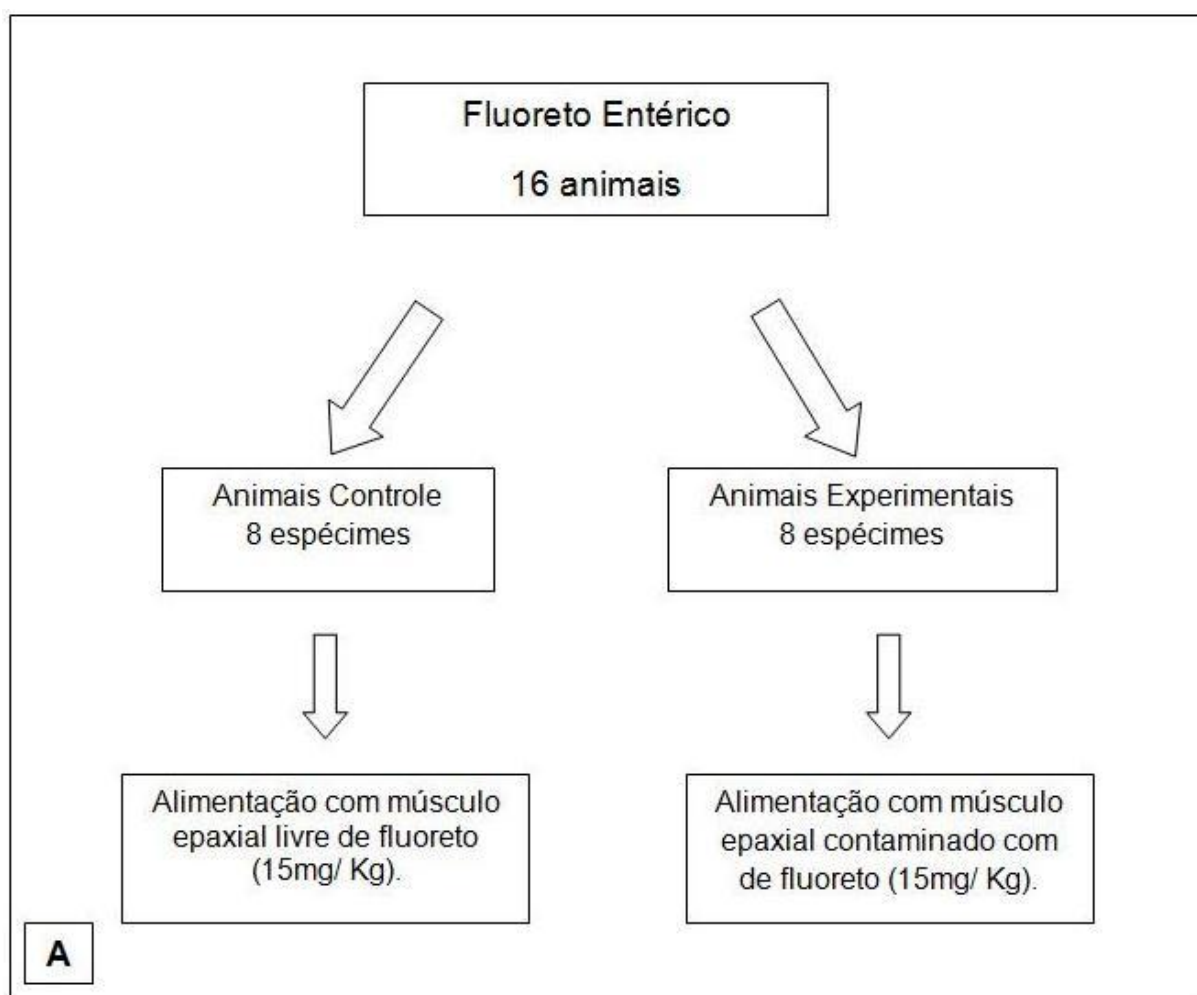


Figura 10: Módulo de aquário da Estação Antártica Comandante Ferraz (A). Espécimes de *N. corriceps* acondicionados em tanque (B). (Fotos: Edson Rodrigues Júnior).

Os experimentos em ambiente hiposmótico foram conduzidos reduzindo a salinidade, gradativamente, ao longo de um período de 6 horas, adicionando água doce nos aquários. A alimentação, a base de músculo epaxial de peixes Antárticos, foi oferecida diariamente na quantidade correspondente a 1% da sua massa corpórea.

Posterior ao período de aclimação, os peixes foram submetidos a diferentes condições experimentais durante 11 dias, em temperaturas de 0°C e 4°C, salinidade de 35 e 20 psu e fluoreto via entérica e peritoneal(15mg/kg) conforme os modelos experimentais esquematizados na Fig. 11.



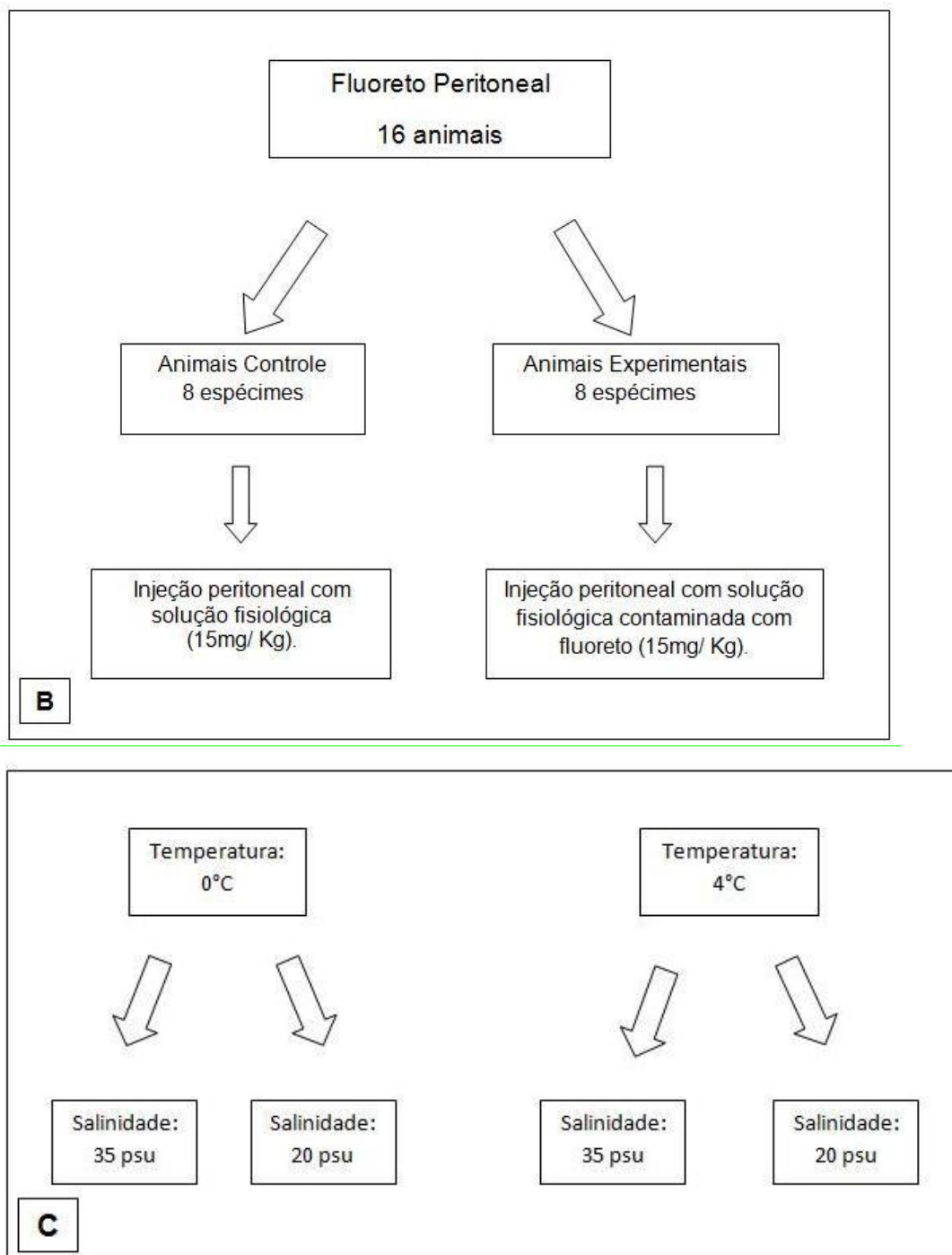


Figura 11 - Desenho esquemático do protocolo experimental de Fluorose Induzida Via Entérica (A). Desenho esquemático do protocolo experimental de Fluorose Induzida Via Peritoneal (B). Delineamento experimental das variáveis das condições experimentais (C).

Após o término do experimento os animais foram anestesiados com benzocaína (na proporção de 1 grama para 20 litros de água) e em seguida sacrificados com secção da coluna vertebral. As brânquias foram imediatamente coletadas e duas porções do segundo arco branquial separadas, e fixadas para análise microscópica e ultraestrutural.

4.4. Processamento histológico e ultraestrutural

A porção branquial coletada para microscopia de luz foi fixada em ALFAC (álcool 80%, formaldeído e ácido acético glacial) durante 16 horas. Depois da fixação, as peças foram transferidas para o álcool 70%, onde permaneceram até o início do processamento histológico realizado no Laboratório de Biologia Adaptativa na Universidade Federal do Paraná.

A desidratação ocorreu em série alcoólica crescente e a diafanização ocorreu em Xilol. Para impregnação e inclusão utilizou-se Paraplast Plus® Sigma. A microtomia foi feita em Micrótomo da marca Leica RM 2145. Os cortes de 5 µm de espessura, foram aderidos às lâminas com Albumina de Meyer 1%. A coloração realizada com Hematoxilina e Eosina (Clark, 1981), com o intuito de evidenciar as estruturas celulares. O meio de montagem utilizado foi o Polymount® (Sigma). As lâminas foram previamente selecionadas e posteriormente analisadas e fotografadas em Fotomicroscópio Olympus PM AD.

Na Fig. 12 temos o fluxograma da microscopia óptica utilizada.

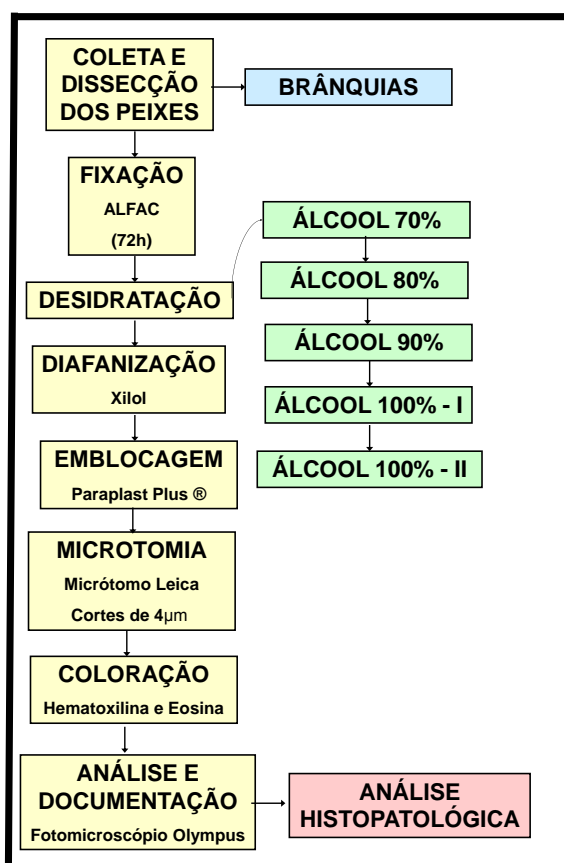


Figura 12: Fluxograma do processamento de Microscopia de Luz.

Para microscopia eletrônica, de varredura e transmissão, a porção branquial foi fixada em Karnovsky (paraformaldeído 2%, glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato 0,1M pH 7,2 a 4⁰C) (Karnovsky, 1965).

Para microscopia eletrônica de transmissão, o material foi pós-fixado em tetróxido de ósmio a 2% em tampão cacodilato 0,1M pH 7,2 a 4⁰C durante 1 hora. A contrastação em blocos foi feita com acetato de uranila 2% durante 2 horas. O material foi desidratado em série alcoólica crescente e sem seguida colocado em acetona. A impregnação e inclusão ocorreram em resina Epon-812 (Luft, 1961). Os cortes foram obtidos em ultramicrotomo Sorval Porter Blum MT-2 com utilização de navalhas de vidro e de diamante. Os cortes ultra-finos foram contrastados em solução aquosa de acetato de uranila 2%(Watson, 1958) e nitrato/acetato de chumbo (Reynolds, 1963). A observação do material foi realizada em microscópio eletrônico de transmissão JOEL 1200EX II Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR.

Na Fig. 13 temos o fluxograma de microscopia eletrônica de transmissão utilizada.

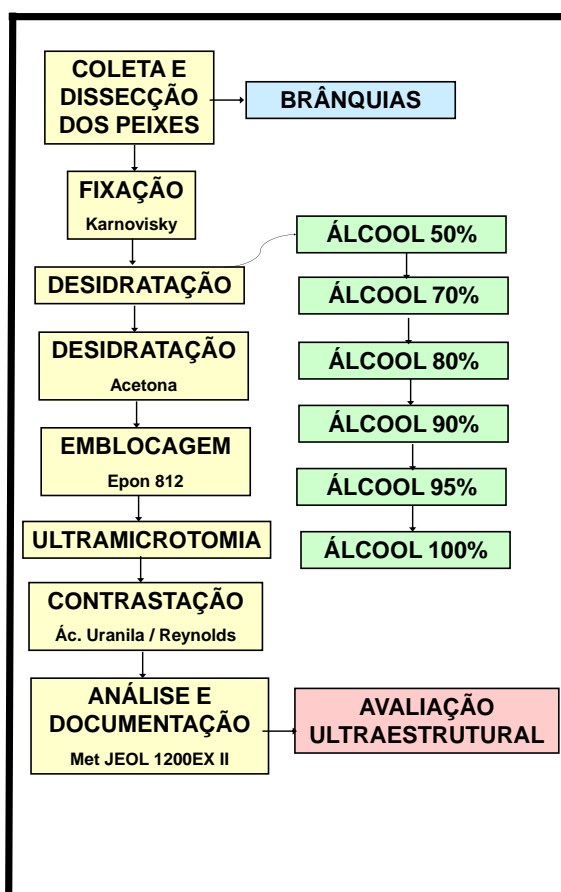


Figura. 13: Fluxograma do processamento de Microscopia Eletrônica de Transmissão.

Para processamento em microscopia eletrônica de varredura após fixação em Karnovsky o material foi desidratado em série alcoólica crescente e acetona. O ponto crítico foi obtido em um Bal-Tec CPD – 030 com gás carbônico. A metalização em ouro foi obtida em um Balzers SCD – 030. As análises e a documentação do material foram feitas no microscópio eletrônico de varredura JEOL-JSM 6360 LV do Centro de Microscopia Eletrônica – UFPR.

Na Fig. 14 temos o fluxograma de microscopia eletrônica de varredura utilizada.

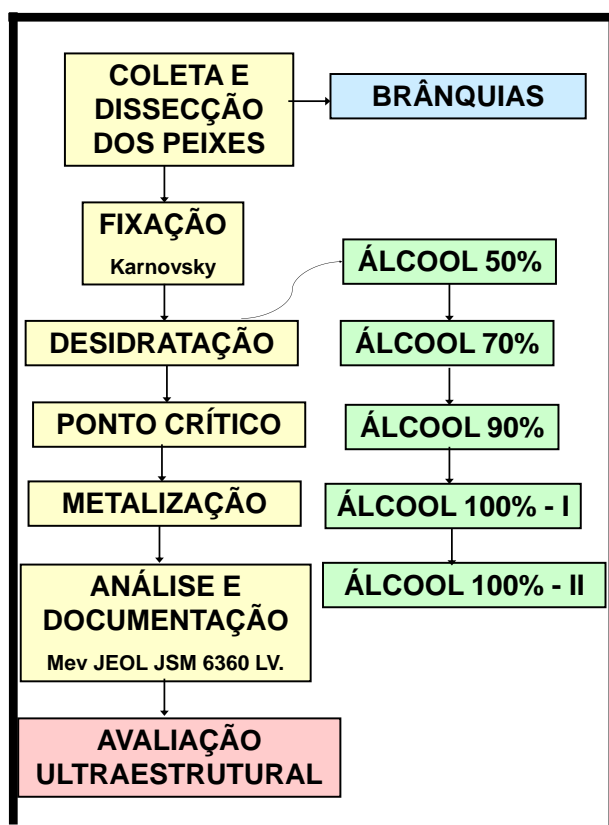


Figura 14: Fluxograma do processamento de Microscopia Eletrônica de Varredura.

4.5. Alterações histológicas analisadas

Descolamento do epitélio respiratório ou edema, hipertrofia das células do epitélio respiratório, proliferação celular ou hiperplasia do epitélio interlamelar (fusão das lamelas respiratórias), aneurisma, talangectasia ou congestão sanguínea, vacuolização e desestruturação das lamelas secundárias foram as alterações histopatológicas identificadas e analisadas segundo Mallat (1985).

4.6. Teste do Quiquadrado

O teste χ^2 (qui-quadrado), com significância de 5%, foi aplicado sobre os valores das freqüências de ocorrência de histopatologias nas duas espécies estudadas, usando o Microsoft Office Excel 2007®.

Os cálculos foram realizados de duas maneiras. Primeiramente o cálculo foi realizado comparando animais controle e experimentais em cada experimento, com o objetivo de verificar se houve diferença significativa na ocorrência de histopatologias apenas pela influência da administração do fluoreto. Posteriormente calculou-se comparando os animais submetidos a estresse térmico e salino com os animais da condição 35psu e 0°C, a fim de verificar se as patologias observadas eram resultado da alteração da salinidade e ou temperatura.

5. Resultados

5.1 Descrição da estrutura branquial padrão de *N. rossii* e *N. coriiceps*

A estrutura brânquial de *N. coriiceps* e *N. rossii* segue a morfologia padrão descrita para outras espécies de peixes teleósteos. Na Figura 15, temos imagens das brânquias dessas espécies nas diferentes técnicas microscópicas utilizadas neste trabalho. Os filamentos, também chamados de lamelas primárias, são duplos e apresentam inúmeras projeções, em ambas as superfícies, ventral e dorsal, as chamadas lamelas secundárias que estão dispostas perpendicularmente às lamelas primárias (Figs.15-A,B). Quanto a organização histológica e ultraestrutural as lamelas secundárias são revestidas por células epiteliais pavimentosas que estão separadas pelas células pilares e pelos espaços sangüíneos(Fig.15-E). Em ambas as espécies foram observadas nas regiões interlamelares e nas lamelas secundárias células de muco (Fig. 15-A) e células de cloreto (Fig. 15-D). As células de muco apresentam, uma aparência granular, com retículo endoplasmático e conseqüentemente o aparelho de Golgi bem desenvolvido (Fig. 15-C). Possuem núcleo de posição basal, com predomínio de eucromatina (Fig. 15-C). Já, as células de cloreto possuem grande quantidade de mitocôndrias com alto polimorfismo e núcleo centralizado (Fig. 15-D).

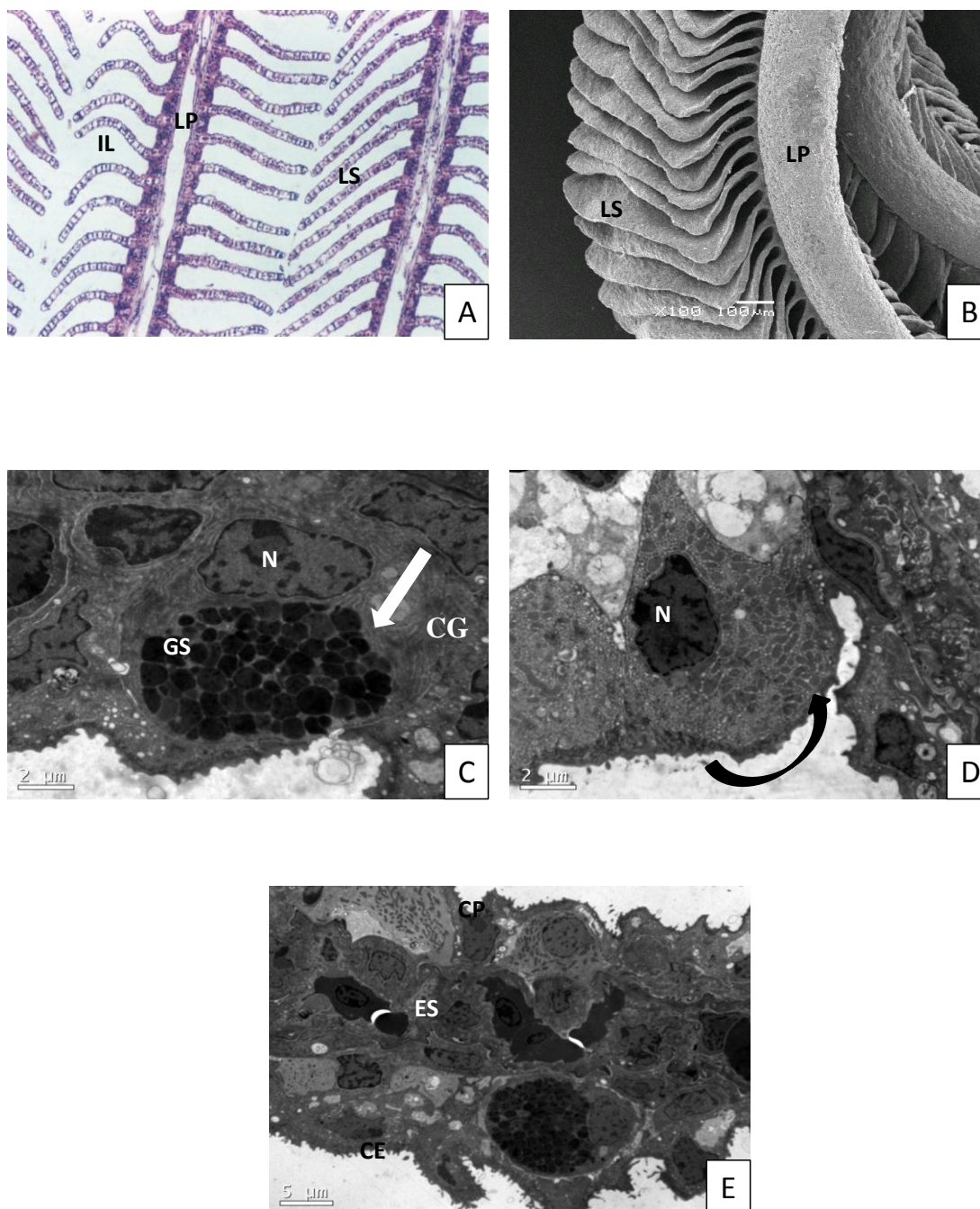


Figura 15: Morfologia padrão da estrutura branquial de *Notothenia rossi* e *Notothenia corriceps* sob as diferentes técnicas de Microscopia utilizadas. **A** - Microscopia de Luz – Aumento: 100x. Observar lamela primária (LP), lamela secundária (LS) e região interlamelar (IL). **B** – Microscopia eletrônica de varredura. Observar lamela primária (LP) e lamela secundária (LS). **C** – Microscopia eletrônica de transmissão. Observar a célula de muco (seta), com núcleo em posição basal (N), complexo de Golgi bem desenvolvido e grânulos de secreção (GS). **D** – Microscopia eletrônica de transmissão. Observar célula de cloreto (seta curva) e núcleo (N). **E** – Microscopia eletrônica de transmissão, observar espaço sangüíneo (ES), célula epitelial (CE) e célula pilar (CP).

5.2 Descrição qualitativa das patologias observadas:

Não foi observada alteração ultraestrutural nas brânquias das duas espécies, em nenhuma condição experimental, nas análises de microscopia eletrônica de transmissão. Em microscopia eletrônica de varredura, foi registrada apenas uma imagem do epitélio branquial de *N. coriiceps* apresentando hiperplasia celular na lamela secundária.

Nas Figura 16 e 17 temos imagens em microscopia de luz das alterações morfológicas encontradas quando avaliamos a ação do fluoreto sob a estrutura branquial de *N. rossii* e *N. coriiceps* sob estresse térmico e hiposmótico, via entérico e peritonal.

Vacuolização e hipertrofia das células do epitélio respiratório não foram observadas em nenhum espécime analisado, tanto de *N. rossii* quanto de *N. coriiceps*. O descolamento branquial caracteriza-se pela formação de um espaço que pode ser preenchido por água, separando as células pilares do epitélio lamelar, aumentando a distância entre o sangue e o meio externo (Fig. 16-A, B e C). O descolamento do epitélio branquial foi observado nas duas espécies em praticamente todas as condições experimentais, com exceção de *N. rossii* submetido à 0°C a 20 psu. Inclusive em animais controle e experimentais. A proliferação celular também conhecida como hiperplasia do epitélio interlamelar origina-se de um aumento de células na estrutura branquial muitas vezes resultando da fusão das lamelas respiratórias (Fig. 17-C, D e E). Aneurisma, talangectasia ou congestão sanguínea foi outra alteração patológica observada nas duas espécies analisadas. Ocorre o aumento do volume de sangue em uma região por intensificação do aporte sanguíneo ou diminuição do escoamento venoso. Quando há lesão das células pilares, esta congestão é seguida de uma dilatação do espaço sanguíneo (Fig. 17-A e B). A desestruturação das lamelas secundárias caracterizou-se pela perda da estrutura padrão dessas lamelas (Fig. 16-D).

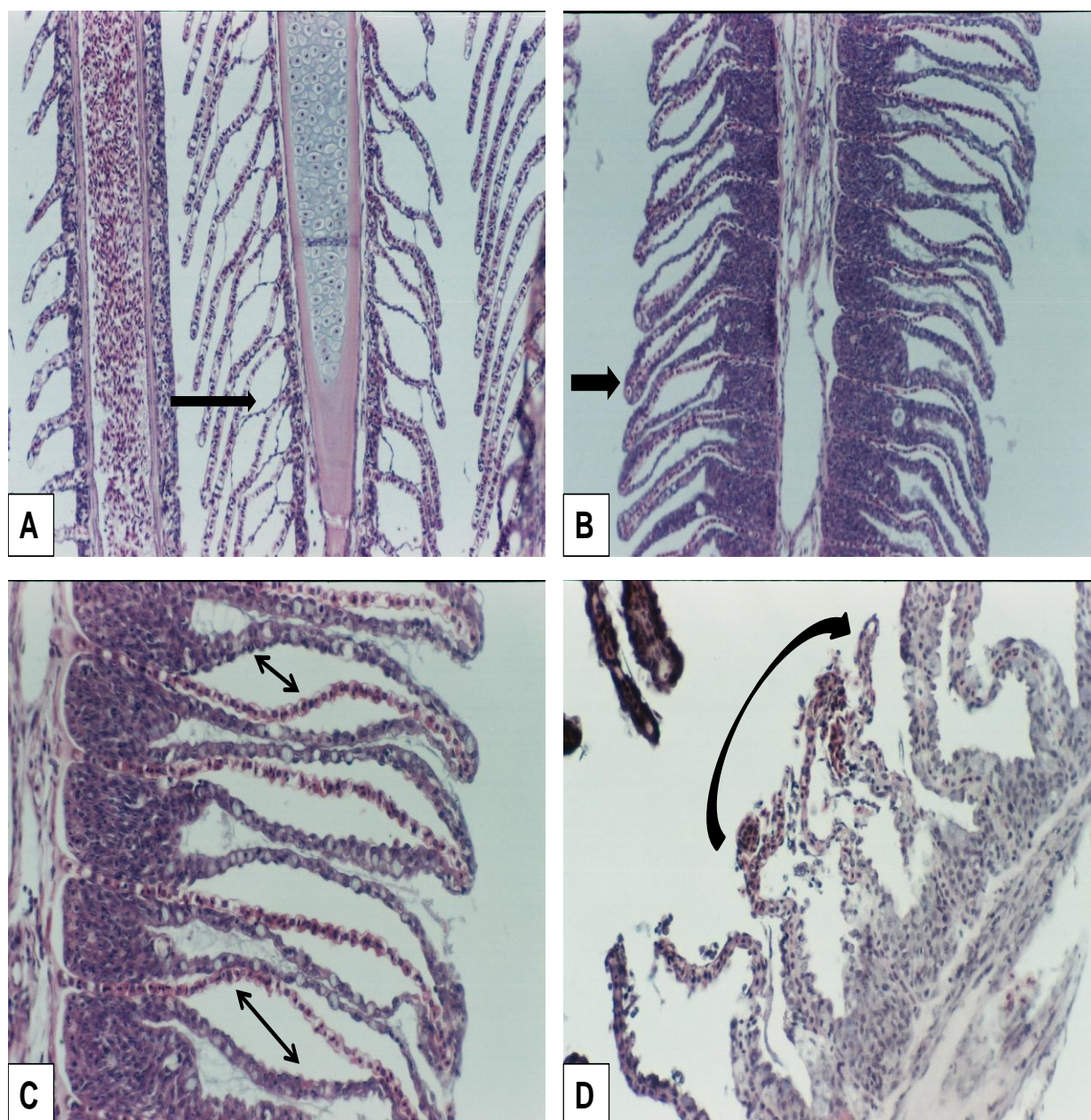


Figura 16. Microscopia de Luz das alterações histopatológicas branquiais encontradas em *Notothenia rossii* e *Notothenia corriceps*. Em (A) observar o epitélio branquial, com descolamento, de um espécime *N. rossii*, submetido a 0°C e 20 psu, com fluoreto administrado via peritoneal. Aumento: 50x. Em (B) e (C) observar o epitélio branquial, também com descolamento, de um espécime *N. corriceps* submetido a 4°C e 20 psu, com fluoreto administrado via peritoneal. Aumentos: 100x e 200x respectivamente. Em (D) é possível observar a desestruturação das lamelas secundárias de um espécime *N. corriceps* submetido 0°C e 35 psu, com fluoreto administrado via entérica. Aumento: 200x.

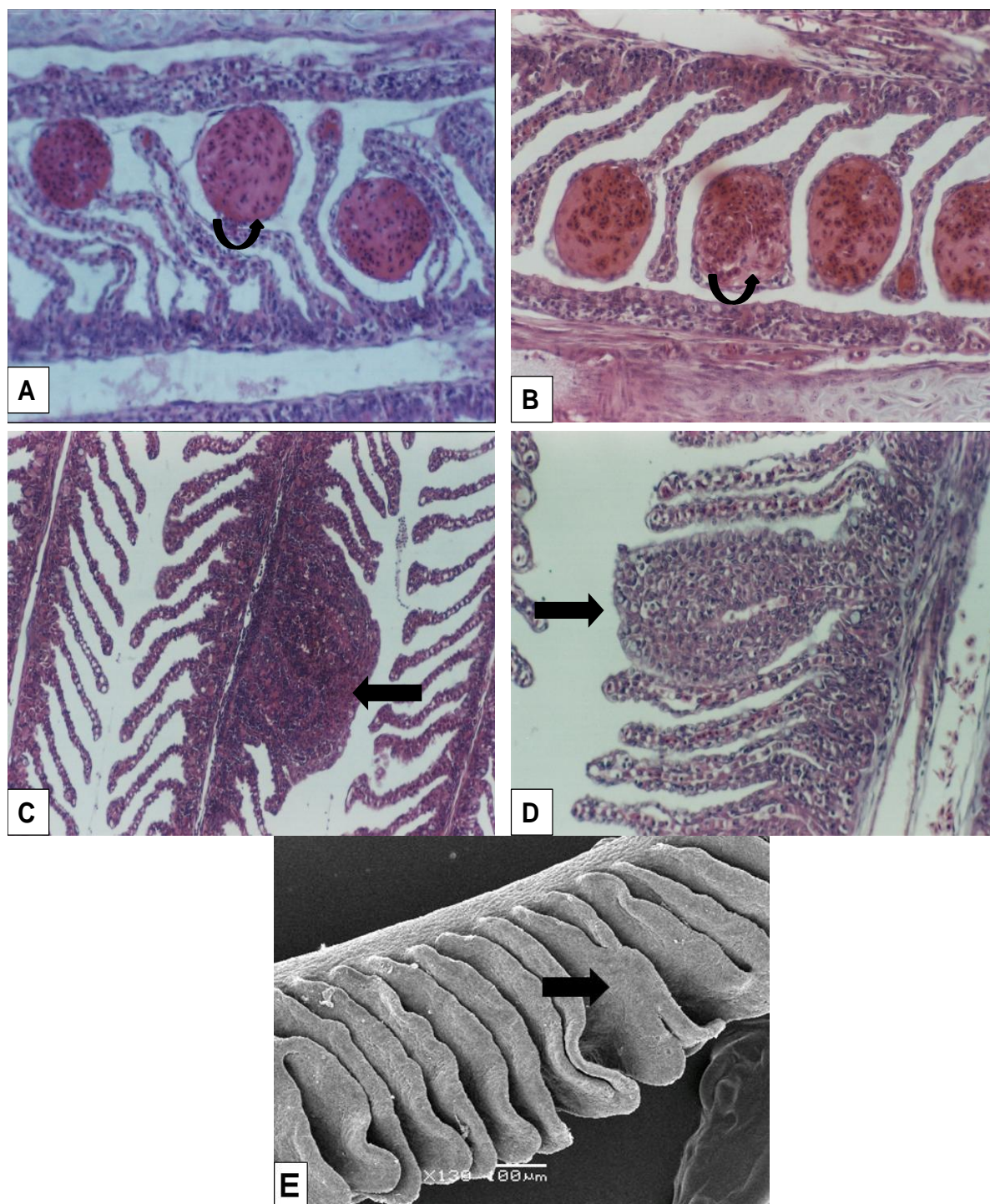


Figura 17: Epitélio branquial de *N. rossii* e *N. corriceps* em duas técnicas de microscopia. (A), (B), (C) e (D), são imagens de microscopia de luz e (E) de microscopia eletrônica de varredura. É possível observar em (A) e (B), o epitélio branquial de *N. rossii* (animal experimental) submetido à 4°C e 20psu, com fluoreto administrado via peritoneal, apresentando aneurisma (seta curva). Nota-se aumento no volume de células sanguíneas, na extremidade das lamelas secundárias. Aumento: A e B = 200x. Em (C) é possível observar epitélio branquial de *N. rossii* (animal experimental), submetido a 0°C e 20psu, com fluoreto administrado via entérica, apresentando hiperplasia das lamelas (seta). Aumento: 100x. Em (D) é possível observar epitélio branquial de *N. corriceps* (animal controle), submetido a 0°C e 35psu, com fluoreto administrado via entérica, apresentando hiperplasia das células, levando inclusive à fusão das lamelas. Aumento: 100x. Em (E) é possível observar o epitélio branquial de *N. corriceps* (animal controle), submetido a 0°C e 35psu, com fluoreto administrado via entérica, com hiperplasia de células levando à fusão de lamelas.

5.3 Análises quantitativas das patologias observadas

5.3.1 Análises histopatológicas de *Notothenia rossii* - Fluorose induzida por via entérica.

A ação do fluoreto, via entérica, na estrutura branquial de *Notothenia rossii* sob estresse térmico e hiposmótico pode ser visualizada na Tabela 01 e Figura 18.

Tabela 1: Porcentagem de alterações histopatológicas encontradas em espécimes de *Notothenia rossii* submetidos à diferentes condições de temperatura e salinidade de fluorose induzida via entérica.

Experimento Alimentação	Controle/ Experimentais	Nº Indivíduos	Descolamento Branquial	%	Hiperplasia	%	Aneurisma	%
0°C e 35 psu	Controle	8	7 indivíduos	87,5	1 indivíduo	12,5	3 indivíduos	37,5
0°C e 35 psu	Experimentais	8	8 indivíduos	100	2 indivíduos	25	2 indivíduos	25
0°C e 20 psu	Controle	7	0 indivíduos	0	1 indivíduo	14,29	2 indivíduos	28,57
0°C e 20 psu	Experimentais	8	0 indivíduos	0	2 indivíduos	25	4 indivíduos	50
4°C e 35psu	Controle	7	6 indivíduos	85,71	1 indivíduo	14,29	1 indivíduo	14,29
4°C e 35psu	Experimentais	9	9 indivíduos	100	2 indivíduos	22,22	2 indivíduos	22,22
4°C e 20psu	Controle	7	7 indivíduos	100	3 indivíduos	42,85	3 indivíduos	42,85
4°C e 20psu	Experimentais	8	8 indivíduos	100	3 indivíduos	37,5	1 indivíduo	12,5

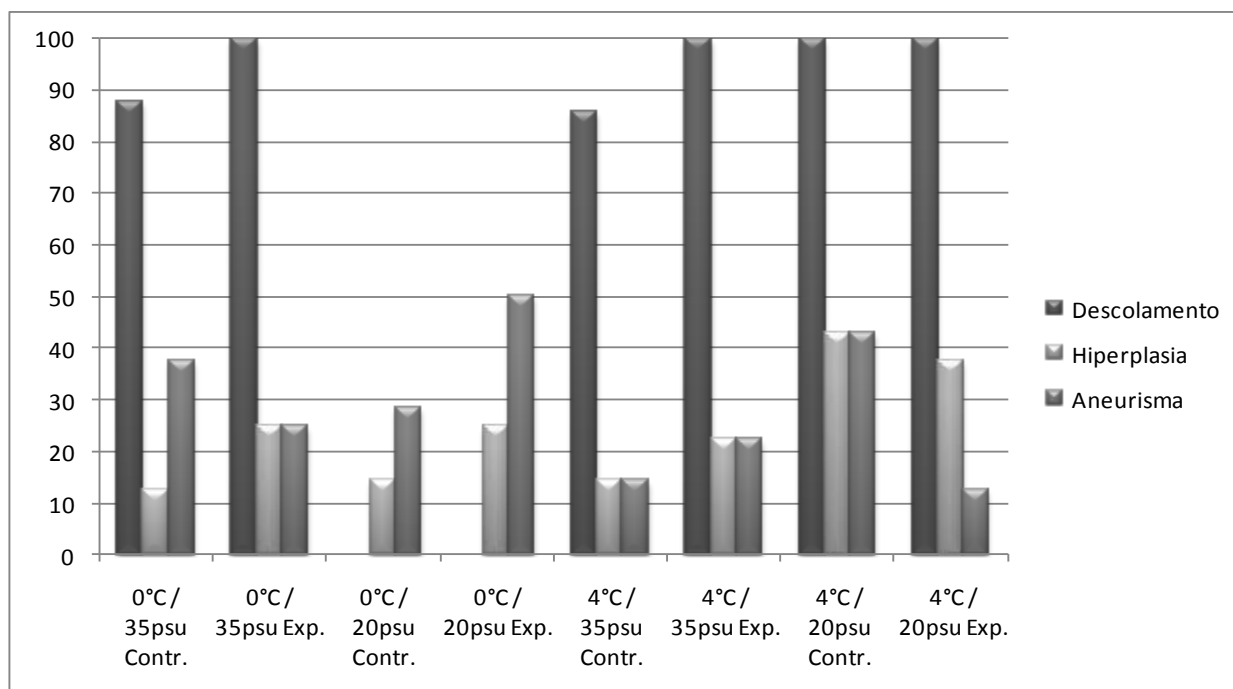


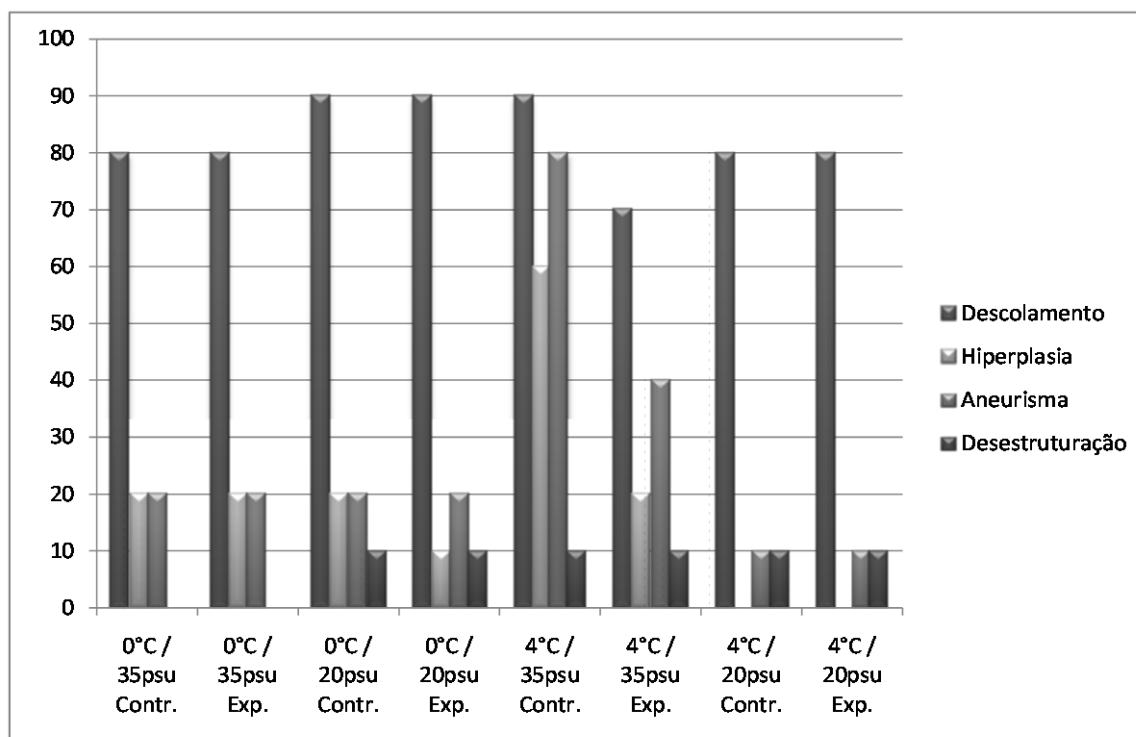
Figura 18- Porcentagem de lesões histopatológicas encontradas, em animais controle (alimentados com músculo livre de fluoreto) e experimentais (alimentados com músculo contaminado com fluoreto) submetidos a diferentes condições de temperatura e salinidade.

5.3.2 Análises histopatológicas de *Notothenia rossii* - Fluorose induzida por via peritoneal.

A ação do fluoreto, via peritoneal, na estrutura branquial de *Notothenia rossii* sob estresse térmico e hiposmótico pode ser visualizada na Tabela 02 e Figura 19.

Tabela 2: Porcentagem de alterações histopatológicas encontradas em espécimes de *Notothenia rossii* submetidos à diferentes condições de temperatura e salinidade. Nesta tabela estão listados os animais experimentais e controle, de fluorose induzida via peritoneal.

Experimento Injeção Peritoneal	Controle/ Experimentais	Nº Indivíduos	Descolamento Branquial	%	Hiperplasia	%	Aneurisma	%	Desestruturação	%
0°C e 35 psu	Controle	10	10 indivíduos	100	5 indivíduo	50	1 indivíduos	10	0 indivíduos	0
0°C e 35 psu	Experimentais	10	8 indivíduos	80	2 indivíduos	20	2 indivíduos	20	0 indivíduos	0
0°C e 20 psu	Controle	10	6 indivíduos	60	2 indivíduos	20	0 indivíduos	0	2 indivíduos	20
0°C e 20 psu	Experimentais	10	9 indivíduos	90	1 indivíduo	10	2 indivíduos	20	1 indivíduos	10
4°C e 35psu	Controle	10	9 indivíduos	90	6 indivíduo	60	8 indivíduo	80	1 indivíduo	10
4°C e 35psu	Experimentais	10	7 indivíduos	70	2 indivíduos	20	4 indivíduo	40	1 indivíduo	10
4°C e 20psu	Controle	8	7 indivíduos	87,5	1 indivíduos	12,5	3 indivíduos	37,5	2 indivíduos	25
4°C e 20psu	Experimentais	10	8 indivíduos	80	0 indivíduos	0	1 indivíduo	10	1 indivíduo	10



19- Porcentagem de lesões histopatológicas encontradas, em animais controle (recebiam injeção peritoneal com solução fisiológica) e experimentais (recebiam injeção peritoneal com solução fisiológica contaminada com fluoreto) submetidos a diferentes condições de temperatura e salinidade.

5.3.3 Análises histopatológicas de *Notothenia coriiceps* - Fluorose induzida por via entérica.

A ação do fluoreto, via entérico, na estrutura branquial de *Notothenia coriiceps* sob estresse térmico e hiposmótico pode ser visualizada na Tabela 03 e Figura 20.

Tabela 3: Porcentagem de alterações histopatológicas encontradas em espécimes de *Notothenia coriiceps* submetidos à diferentes condições de temperatura e salinidade. Nesta tabela estão listados os animais experimentais e controle, de fluorose induzida via entérica.

Experimento Alimentação	Controle/ Experimentais	Nº Indivíduos	Descolamento Branquial	%	Hiperplasia	%	Aneurisma	%
0°C e 35 psu	Controle	8	1 indivíduo	12,5	2 indivíduo	25	2 indivíduos	25
0°C e 35 psu	Experimentais	7	0 indivíduos	-	4 indivíduos	57,14	0 indivíduos	-
0°C e 20 psu	Controle	7	7 indivíduos	100	1 indivíduo	14,29	1 indivíduo	14,29
0°C e 20 psu	Experimentais	6	6 indivíduos	100	1 indivíduo	16,67	0 indivíduos	-
4°C e 35psu	Controle	5	5 indivíduos	100	0 indivíduos	-	0 indivíduos	-
4°C e 35psu	Experimentais	8	8 indivíduos	100	2 indivíduos	25	0 indivíduos	-
4°C e 20psu	Controle	8	4 indivíduos	50	0 indivíduos	-	1 indivíduo	-
4°C e 20psu	Experimentais	10	6 indivíduos	60	0 indivíduos	-	1 indivíduo	-

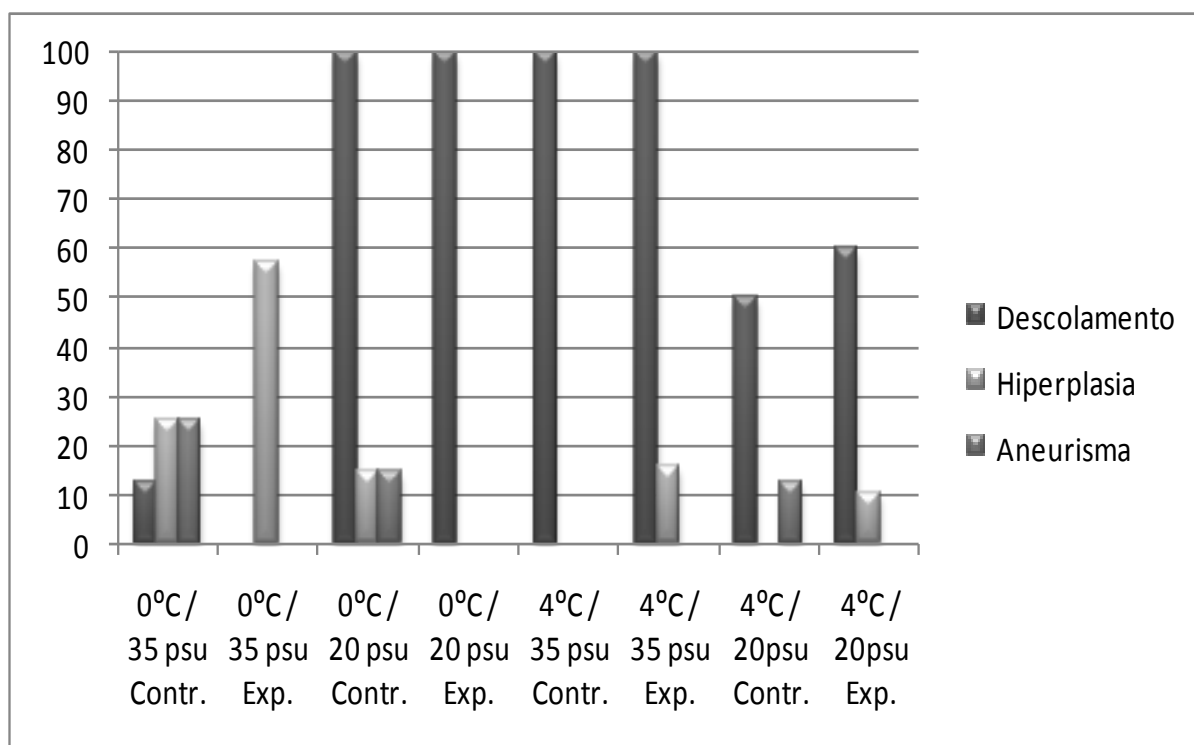


Figura 20- Porcentagem de lesões histopatológicas encontradas, em animais controle (alimentados com músculo livre de fluoreto) e experimentais (alimentados com músculo contaminado com fluoreto) submetidos a diferentes condições de temperatura e salinidade.

5.3.4. Análises histopatológicas de *Notothenia corriceps* - Fluorose induzida por via peritoneal.

A ação do fluoreto, via peritoneal, na estrutura branquial de *Notothenia corriceps* sob estresse térmico e hiposmótico pode ser visualizada na Tabela 04 e Figura 21.

Tabela 4: Porcentagem de lesões histopatológicas encontradas em espécimes de *Notothenia rossii* submetidos à diferentes condições de temperatura e salinidade. Nesta tabela estão listados os animais experimentais e controle, de fluorose induzida via peritoneal.

Experimento Injetável Peritoneal	Controle/ Experimentais	Nº Indivíduos	Descolamento Branquial	%	Hiperplasia	%	Aneurisma	%
0°C e 35 psu	Controle	9	9 indivíduos	100	0 indivíduo	-	0 indivíduos	-
0°C e 35 psu	Experimentais	5	5 indivíduos	100	0 indivíduos	-	0 indivíduos	-
0°C e 20 psu	Controle	6	3 indivíduos	50	0 indivíduo	-	1 indivíduo	16,67
0°C e 20 psu	Experimentais	7	3 indivíduos	42,86	0 indivíduo	-	2 indivíduos	28,57
4°C e 35psu	Controle	8	5 indivíduos	62,5	1 indivíduo	12,5	1 indivíduo	12,5
4°C e 35psu	Experimentais	10	5 indivíduos	50	1 indivíduo	10	0 indivíduos	-
4°C e 20psu	Controle	10	7 indivíduos	70	2 indivíduos	20	2 indivíduos	20
4°C e 20psu	Experimentais	14	10 indivíduos	71,42	3 indivíduos	21,43	1 indivíduo	7,14

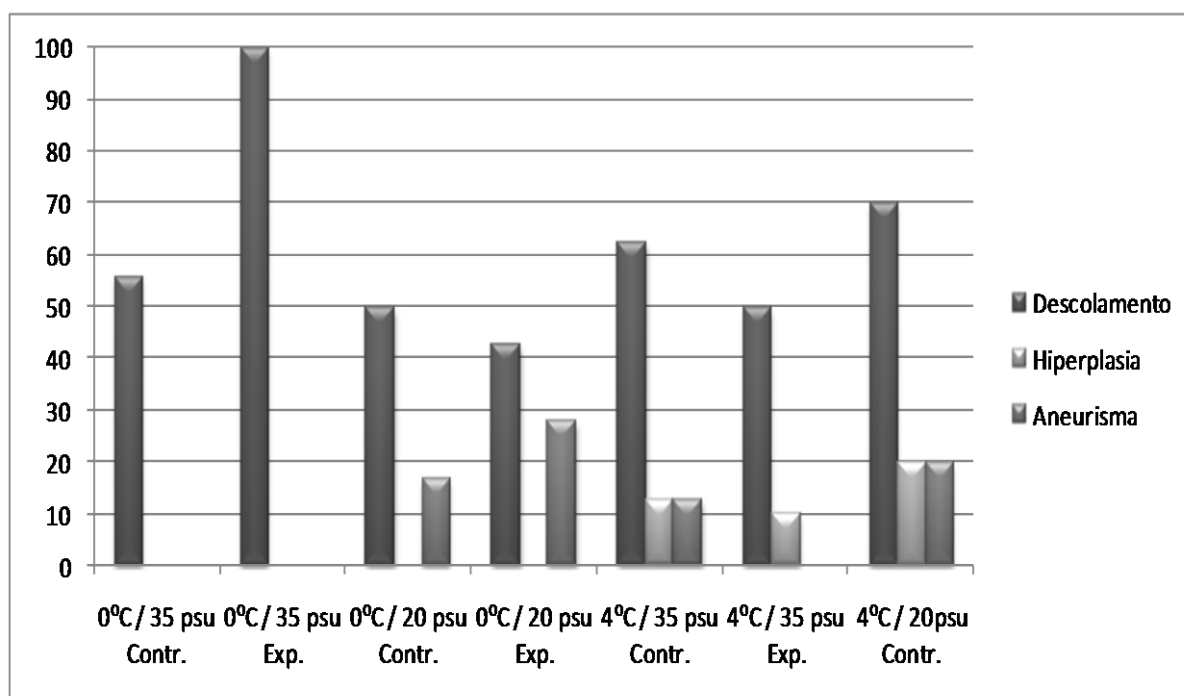


Figura 21. Porcentagem de lesões histopatológicas encontradas, em animais controle (recebiam injeção peritoneal com solução fisiológica) e experimentais (recebiam injeção peritoneal com solução fisiológica contaminada com fluoreto) submetidos a diferentes condições de temperatura e salinidade.

5.3.5. Análise comparativa das histopatologias encontradas em *Notothenia rossi* e *Notothenia coriiceps* - Fluorose induzida por via entérica.

Na Figura 22 temos a análise comparativa da fluorose induzida por via entérica entre *Notothenia coriiceps* e *Notothenia rossi*,

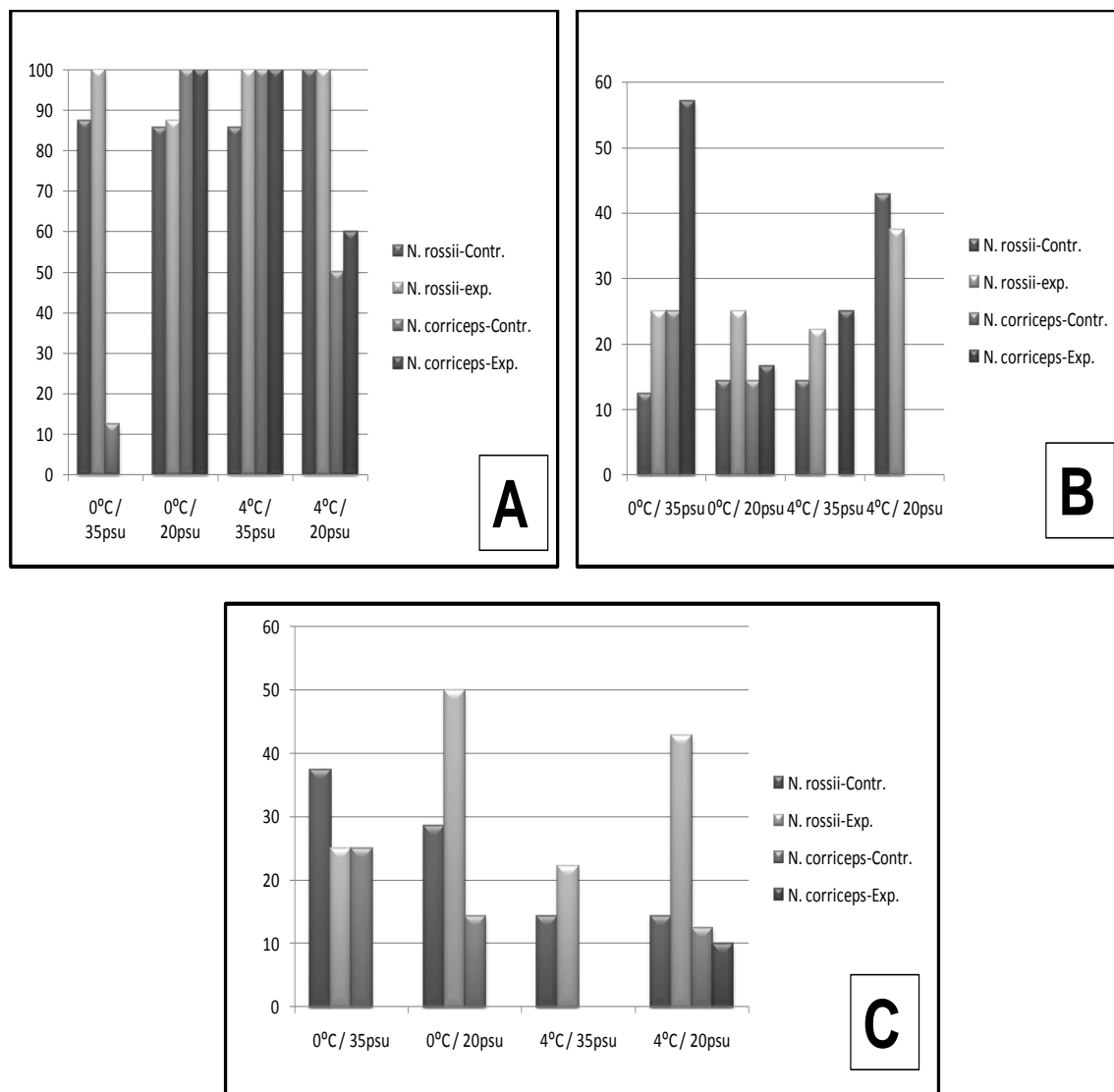


Figura 22. Porcentagem de alterações histopatológicas encontradas, em animais controle e experimentais das diversas condições experimentais de fluorose induzida via entérica. Comparação entre *Notothenia rossi* e *Notothenia coriiceps*. (A) Comparação da frequência de descolamento do epitélio respiratório nas duas espécies, sob as diferentes condições de estresse térmico e salino. (B) Comparação da frequência de hiperplasia lamelar nas duas espécies, sob as diferentes condições de estresse térmico e salino. (C) Comparação da frequência de aneurisma no epitélio branquial duas espécies, sob as diferentes condições de estresse térmico e salino.

5.3.6. Análise comparativa das histopatologias encontradas em *Notothenia rossi* e *Notothenia corriceps* - Fluorose induzida por via peritoneal.

Na Figura 23 temos a análise comparativa da fluorose induzida por via peritoneal entre *Notothenia corriceps* e *Notothenia rossi*.

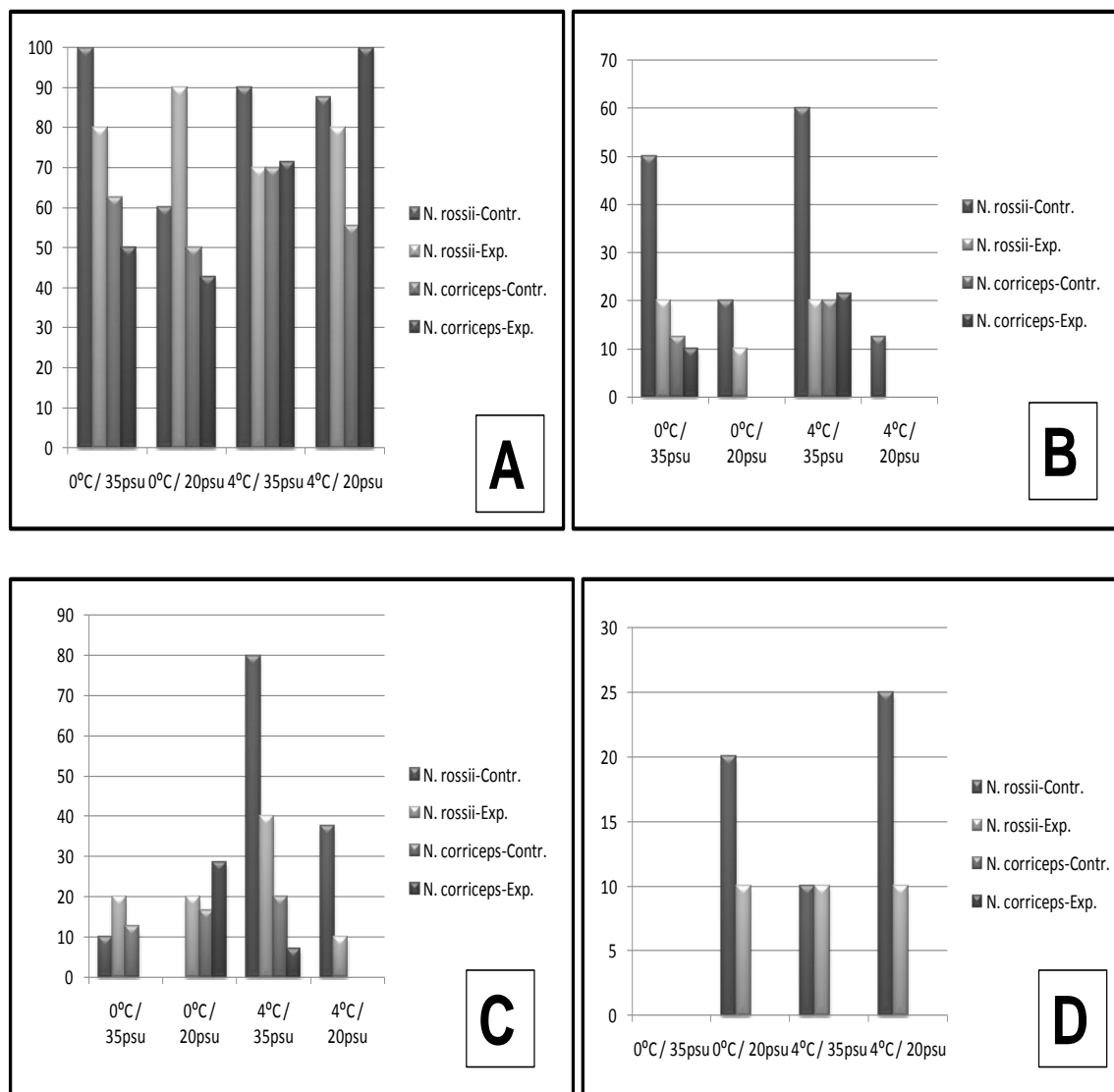


Figura 23. Porcentagem de lesões histopatológicas encontradas, em animais controle e experimentais das diversas condições experimentais de fluorose induzida via peritoneal. Comparação entre *Notothenia rossi* e *Notothenia corriceps*. (A) Comparação da frequência de descolamento do epitélio respiratório nas duas espécies, sob as diferentes condições de estresse térmico e salino. (B) Comparação da frequência de hiperplasia lamelar nas duas espécies, sob as diferentes condições de estresse térmico e salino. (C) Comparação da frequência de aneurisma no epitélio branquial duas espécies, sob as diferentes condições de estresse térmico e salino. (D) Comparação da frequência de desestruturação das lamelas secundárias duas espécies, sob as diferentes condições de estresse térmico e salino.

5.3.7 – Teste de Hipótese.

Nas tabelas 5 e 6 temos o teste do quiquadrado, com significância de 5%, para verificar se houve diferença significativa entre os animais controle e experimentais de cada situação experimental.

Tabela 5. Teste do quiquadrado realizado os animais controle e experimentais de cada bioensaio. Fluorose induzida via entérica.

Experimento Alimentação	Espécie	Descolamento Branquial	Hiperplasia	Aneurisma
0°C e 35 psu	<i>N. rossii</i>	0.066	0.25	0.1
0°C e 20 psu	<i>N. rossii</i>	0	0.214	0.429
4°C e 35 psu	<i>N. rossii</i>	0.0856	0.133	0.133
4°C e 20 psu	<i>N. rossii</i>	0	0.027	1.29
0°C e 35 psu	<i>N. corriceps</i>	0.4168	0.8786	1.7297
0°C e 20psu	<i>N. corriceps</i>	3.9334	0.0123	0.8518
4°C e 35psu	<i>N. corriceps</i>	0	1.252	-----
4°C e 20psu	<i>N. corriceps</i>	0.0784	-----	0.0245

Tabela 6. Teste do quiquadrado realizado os animais controle e experimentais de cada bioensaio. Fluorose induzida via peritoneal.

Experimento Alimentação	Espécie	Descolamento Branquial	Hiperplasia	Aneurisma
0°C e 35 psu	<i>N. rossii</i>	0.2222	1.286	0.334
0°C e 20 psu	<i>N. rossii</i>	0.6	1.0	0.334
4°C e 35 psu	<i>N. rossii</i>	0.25	2.0	2.0
4°C e 20 psu	<i>N. rossii</i>	0.03	1.252	1.512
0°C e 35 psu	<i>N. corriceps</i>	0.8908	----	----
0°C e 20psu	<i>N. corriceps</i>	0.0355	----	0.1937
4°C e 35psu	<i>N. corriceps</i>	0.1472	0.1472	1.2727
4°C e 20psu	<i>N. corriceps</i>	0.0015	0.0015	0.7714

Nas tabelas 7 e 8 temos o teste do quiquadrado para verificar se houve diferença significativa entre os animais controle e experimentais de cada situação experimental.

Tabela 7. Teste do quiquadrado realizado entre os animais controle (35psu e 0°C) versus os animais experimentais e controle de cada bioensaio realizado. Fluorose induzida via entérica.

Experimento Alimentação	Controle/ Experimentais	Espécie	Descolamento Branquial	Hiperplasia	Aneurisma
0°C e 20 psu	Controle	<i>N. rossii</i>	6.126	0.00405	0.09
0°C e 20 psu	Experimentais	<i>N. rossii</i>	7.0	0.334	0.142
4°C e 35psu	Controle	<i>N. rossii</i>	0.0013	0.008	0.755
4°C e 35psu	Experimentais	<i>N. rossii</i>	0.07	4.075	0.336
4°C e 20psu	Controle	<i>N. rossii</i>	0.062	1.29	0.0268
4°C e 20psu	Experimentais	<i>N. rossii</i>	0.066	1.0	1.0
0°C e 20 psu	Controle	<i>N. corriceps</i>	5.371	0.2143	0.2143
0°C e 20 psu	Experimentais	<i>N. corriceps</i>	5.25	0.2844	1.5088
4°C e 35psu	Controle	<i>N. corriceps</i>	2.8238	1.222	-----
4°C e 35psu	Experimentais	<i>N. corriceps</i>	5.44	0	-----
4°C e 20psu	Controle	<i>N. corriceps</i>	1.8	0	0.3333
4°C e 20psu	Experimentais	<i>N. corriceps</i>	2.576	----	0.6063

Tabela 8. Teste do quiquadrado realizado entre os animais controle (35psu e 0°C) versus os animais experimentais e controle de cada bioensaio realizado. Fluorose induzida via peritoneal.

Experimento Alimentação	Controle/ Experimentais	Espécie	Descolamento Branquial	Hiperplasia	Aneurisma
0°C e 20 psu	Controle	<i>N. rossii</i>	1.0	1.0	----
0°C e 20 psu	Experimentais	<i>N. rossii</i>	0.052	0.334	----
4°C e 35psu	Controle	<i>N. rossii</i>	0.052	5.444	----
4°C e 35psu	Experimentais	<i>N. rossii</i>	0.53	1.8	----
4°C e 20psu	Controle	<i>N. rossii</i>	0.074	1.512	2.499
4°C e 20psu	Experimentais	<i>N. rossii</i>	0.222	0	1.0
0°C e 20 psu	Controle	<i>N. corriceps</i>	0.0208	1.5	----
0°C e 20 psu	Experimentais	<i>N. corriceps</i>	1.435	1.420	----
4°C e 35psu	Controle	<i>N. corriceps</i>	0.0361	1.1276	----
4°C e 35psu	Experimentais	<i>N. corriceps</i>	1.256	0	----
4°C e 20psu	Controle	<i>N. corriceps</i>	0.1546	1.8048	----
4°C e 20psu	Experimentais	<i>N. corriceps</i>	0.378	0.357	----

6. Discussão e Conclusão

O presente trabalho teve por objetivo avaliar a ação do fluoreto sob estresse térmico e salino, na estrutura branquial de *Notothenia rossii* e *Notothenia corriceps* que representam duas das quatro espécies de peixes mais abundantes da Baía do Almirantado. Diante disto, duas vias de administração do fluoreto foram escolhidas: a via entérica, simulando uma situação que ocorre na natureza e a via peritoneal, que possibilita o contato direto do fluoreto com os órgãos onde ele é metabolizado. Na literatura existem alguns trabalhos envolvendo fluorose que discutem essas duas vias de ação (Camargo, 2003, Camargo e Tarazona, 1991; Bacila et al., 1989).

Os níveis de fluoreto no ecossistema marinho Antártico são elevados e os seus mecanismos de ação nos diferentes organismos pertencentes a cadeia trófica Antártica é ainda desconhecido. Por exemplo, sabe-se que a concentração de fluoreto no exoesqueleto de crustáceos marinhos varia de aproximadamente 20 a 6000 $\mu\text{gF}/\text{g}$ de peso seco. As maiores concentrações de fluoreto foram encontradas no exoesqueleto dos crustáceos antárticos, *Euphausia crystallorophias* (5977 $\mu\text{gF}/\text{g}$ de peso seco) e *E. superba* (2594 $\mu\text{gF}/\text{g}$ de peso seco), embora a concentração muscular sejam relativamente baixas, variando entre 0,78 à 257 $\mu\text{gF}/\text{g}$ de peso seco (Adelung et al. 1987; Sands et al. 1998). Não há registros na literatura da quantidade de *krill*, e conseqüentemente de fluoreto que os peixes antárticos ingerem diariamente. Existem somente dados relacionados a valores de fluoreto no tecido ósseo de peixes antárticos (Oehlenschläger e Manthey, 1982). Portanto, a dose de fluoreto (15mg/Kg), que corresponderia a 50 gramas de *krill* por quilo de peixe, administrada nos diversos experimentos deste trabalho se baseou em dados existentes na literatura relacionados ao consumo diário de *krill* por pinguins, que podem ingerir até um quilo de *krill* por dia (Volkman, et al, 1980).

A ação do fluoreto associado ao estresse térmico e salino, neste trabalho, foi estudada na estrutura branquial de peixes antárticos, pois as brânquias podem exibir alterações morfológicas e funcionais, na presença de agentes estressantes. Essas alterações são consideradas por muitos autores, em estudos com peixes tropicais, como mecanismos de defesa, já que algumas levam ao aumento da distância entre o meio externo e o meio interno, diminuindo assim a área da superfície em contato com o agente estressante (Mallat, 1985). Agentes estressantes geralmente provocam alterações no tecido branquial promovendo a

perda da integridade do epitélio respiratório bem como das células pilares adjacentes provocando a diminuição das funções de troca gasosa e regulação iônica ocorridas no epitélio respiratório (Mallat, 1985). Deve-se lembrar que, as brânquias exercem várias funções nos peixes, estando envolvidas nos mecanismos celulares da respiração, osmorregulação e excreção além de locais em que ocorrem à depuração de contaminantes, a detoxificação e o metabolismo destes agentes tóxicos (Randal, *et al.*, 2000)

Os experimentos realizados neste trabalho tiveram a duração de 11 dias e a maior parte dos espécimes submetidos aos experimentos sobreviveu. Foi observada a morte de alguns espécimes, mas de forma isolada. Apesar da aclimação e das medidas visando a diminuição do estresse dos animais em condições laboratoriais, provavelmente, essas mortes devem estar relacionadas ao estresse proveniente da condição laboratorial, da manipulação durante os bioensaios ou no momento da coleta (pesca com anzol e linha) e da própria condição fisiológica do animal proveniente da natureza. Existem dados na literatura que indicam que o tecido ósseo de animais antárticos tampona os altos níveis de fluoreto da dieta, evitando que seus tecidos moles sejam afetados pelo efeito tóxico do fluoreto, assim a fluorose por eles apresentada é assintomática (Adelung, *et. al.*, 1985; Camargo, 2003).

Não foi observada alteração ultraestrutural quando se utilizou a técnica de microscopia eletrônica de transmissão. E houve apenas o registro de uma imagem de hiperplasia celular com fusão lamelar, em *Notothenia corriceps*, animal controle da condição 0°C e 35psu. Isto pode ser explicado pelo baixo número de animais analisados (n=2) e pela pequena área branquial observada em microscopia eletrônica. Não foi utilizado um “n” maior nas análises de microscopia eletrônica devido a limitações técnicas e operacionais existentes, principalmente relacionadas à manutenção dos microscópios eletrônicos do Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR. No entanto, acreditamos que as análises histopatológicas não foram comprometidas já que as mesmas também foram feitas em microscopia de luz, utilizando um “n” e uma área maior de análise. O método de análise utilizado foi o da frequência e ausência e nenhuma metodologia morfométrica específica foi utilizada. As alterações histopatologias observadas foram pontuais e atingiram pequena área branquial. Este fato também dificultou a análise em microscopia eletrônica.

Descolamento branquial, hiperplasia e aneurisma foram as alterações histopatológicas encontradas nas duas espécies analisadas e desestruturação das lamelas secundárias foi observada somente em *Notothenia rossii*. Animais controles e experimentais apresentaram estas alterações que não diferiram significativamente quando verificamos se houve diferença significativa entre os animais controles e os experimentais, salvo *Notothenia coriiceps* exposta a temperatura de 0°C, salinidade de 20psu e fluoreto via entérica. Estes resultados sugerem que a presença de fluoreto não foi determinante para o aparecimento das alterações histopatológicas. Mallat (1985) discute que o surgimento de histopatologias na estrutura branquial de peixes pode ser causado por agentes agressores, dentre ele, substâncias químicas, agentes físicos e/ou biológicos, salinidade e temperatura, estes últimos utilizados neste trabalho. As alterações histopatológicas encontradas neste trabalho de maneira geral levam à diminuição da eficiência das trocas gasosas e para Mallatt (1985) e Ferguson (1995) podem levar inclusive à morte do animal se forem combinadas e estarem na forma severa.

Foi observado apenas no epitélio branquial de espécimes de *Notothenia rossii*, submetidos à 0°C e 20psu e 4°C em ambas as salinidades, a alteração denominada desestruturação de lamelas. Esta histopatologia pode ser causada por um agente agressor e é caracterizada por rompimento do epitélio branquial que pode levar ao extravasamento de células sanguíneas para o meio externo. A desestruturação das lamelas secundárias representa a perda da integridade do epitélio respiratório e do padrão estrutural das lamelas devido à morte generalizada das células. Essa alteração pode ser revertida por proliferação celular e substituição das células mortas (Mallatt, 1985).

Para *Notothenia rossii* o descolamento do epitélio respiratório foi observado em todas as condições experimentais, nas duas vias de administração de fluoreto. Para *Notothenia coriiceps*, a única condição em que não houve registro de descolamento foi em animais experimentais com fluoreto administrado via entérica submetidos a 0°C e 35 psu. O descolamento, assim como a hiperplasia e o aneurisma, tem por característica aumentar o espaço entre o sangue e a água. Quando muito intenso, pode causar necrose das células epiteliais, provocando disfunção respiratória e osmorregulatória (Mallat, 1985; Ferguson, 1995). Pode ocorrer influxo de água devido ao descolamento aumentando ainda mais o edema e

conseqüentemente a própria patologia (Thophon *et al.*, 2003). Quando se comparou os animais experimentais e controle de cada experimento com os animais submetidos à condição experimental de 0°C e 35psu, sem administração de fluoreto via peritonal ou entérico verificamos que nos experimentos de fluorose induzida via entérica, o estresse salino (0°C e 20psu) pode ter interferido na ocorrência de descolamento do epitélio branquial, em ambas as espécies. E o estresse térmico (4°C e 35psu), em animais experimentais da espécie *Notothenia coriiceps*, também pode ter contribuído para a ocorrência dessa patologia, já que houve diferença significativa entre esses casos e os animais controle de 0°C e 35psu. Fanta *et al.* (1995) trabalhando com alterações de salinidade em peixes antárticos associaram alterações de salinidade com o aumento de descolamento do epitélio branquial.

A hiperplasia é decorrente da proliferação celular das lamelas secundárias e pode levar a fusão de duas ou mais dessas estruturas. Pode diminuir a área de contato do epitélio respiratório dificultando assim as trocas gasosas (Ojha, *et al.*, 1989; Fanta e Machado, 2003). Já, o aneurisma provavelmente está relacionado à morte de células pilares, o que resulta na perda de integridade estrutural das lamelas secundárias e o consequente acúmulo de células sanguíneas (Van del Heuvel *et al.*, 2000). Para Mallatt (1985) é uma adaptação celular reversível, voltando a condição normal na ausência do agente agressor.

Neste trabalho, em *Notothenia rossii*, a hiperplasia só não foi observada em 4°C e 20psu, com fluoreto administrado via peritoneal e não houve registro de aneurisma nos animais controle de 0°C e 20psu na via peritoneal. Já, em *Notothenia coriiceps* percebemos uma menor incidência destas duas patologias. Por exemplo, o aneurisma não foi observado em animais submetidos a 4°C e 35psu e em animais experimentais submetidos a 0°C e 20psu com fluoreto administrado via entérico e na via peritoneal em animais experimentais de 0°C e 35psu e em nenhum animal submetido a 4°C e 20psu.

A menor incidência de patologias em *Notothenia coriiceps* não significa necessariamente que esta espécie é menos sensível ao estresse salino e térmico. Outros estudos comparativos devem ser estimulados, já que essas duas espécies são endêmicas do continente Antártico e possuem características evolutivas que permitem a sua sobrevivência em condições tão extremas.

Concluindo, acreditamos que a administração do fluoreto, via entérica ou peritonal, não influenciou o surgimento de patologias como o descolamento do epitélio respiratório, aneurisma, hiperplasia e desestruturação das lamelas secundárias. As alterações brânquiais relatadas neste estudo não são específicas para uma única classe de agente agressor (Mallat, 1985), podendo ser resultado do estresse térmico e salino ao qual os animais deste trabalho foram submetidos.

7. Referências

- ADELUNG, D., K. Bößmann and D. Rößler The distribution of fluoride in some Antarctic Seals. **Polar Biology**. 5:31-34. 1985.
- ADELUNG, D., Buchholz, F., Culik, B. e KECK, A. Fluoride in tissues Krill *Euphausia superb dana* and *Meganyctiphanes norvegica* M. Sars in relation to the moult cycle. **Polar Biology**, v. 7, n.1, p. 43-50. 1987.
- BACILA, M.; Rosa, R.; Rodrigues, E. Fluoride inhibition of enolase from Antarctic organisms. **Pesq. Antart. Bras.** 1(1):31-34. 1989.
- BARNES, D.K.A., Fuentes, V., Clarke, A., Schloss, I.R., Wallace, M.I.. Spatial andtemporal variation in shallow seawater temperatures around Antarctica. Deep-Sea Research Part II: **Topical Studieis in Oceanography** 53, 853-865. 2006.
- BARRERA-ORO, E. R.; Casaux, R.J. Feeding selectivity in *Notothenia neglecta*, Nybelin, from Potter Cove, South Shetland Islands, Antarcctc. *Antarctica Science* 2, 207-213. 1990.
- BARRERA-ORO, E. R.; Piacentino, G. L. M. Feeding habits of juvenile *Trematomus newnesi* (Pisces, Nototheniidae) at Potter Cove, South Shetland Island, Antarctica. **Polar Biology**, 30(6): 789-796. 2006.
- BELLISIO, N. B. Peces antárticos del sector argentino. Taxonomia y biologia de *Chaenocephalus aceratus* y *Notothenia neglecta* de Orcades Del Sur. **Buenos Aires, Secretaria de Marina Servicio de Hidrografia Naval** [Publicacion H. 900, 90 pp.]. 1964.
- BELLISIO, N.; TOMO, A. Biogeografia de la peninsula antartica, archipiélagos y mares adyacentes. **Instituto Antártico Argentino**, Buenos Aires, 222p.1974.
- BHATNAGAR, C., Bhatnagar, M., Regar, B.C. Fluoride-induced histopathological changes in gill, kidney, and intestine of fresh water teleost, *Labeo rohita*. **Research report Fluoride** 40 (1) 55-61. January-March 2007
- BINTANJA, R. Broeke, M. R. **Momentum and scalar transfer coefficients over aerodynamically smooth antarctic surfaces**. 1995.
- BOEUF, G., Payan, P. How should salinity influence fish growth? **Comparative Biochemistry and Physiology** Part C (130) 411 – 423. 2001.
- BURCHETT, M. S. Age and growth of the Antarctic fish *Notothenia rossii* from South Georgia. **Antarctic Survive Bulletin**, nº60: 45-61. 1983.
- CAMARGO, J.A., Fluoride toxicity to aquatic organisms: a review. **Chemosphere** 50, 251-264. 2003.
- CAMARGO, J. A. e Tarazona, J. V. Short-term toxicity of fluoride íon(F-) in soft water to rainbow trout and brow trout. **Chemosphere**, v.22, n. 5-6, p. 605-611. 1991.

CASAUX, R. J., Mazzotta, A. S. e Berrera-Oro, E. R. Seasonal aspects of the biology and diet of nearshore nototheniid fish at Potter Cove, South Shetland Islands, Antarctica. **Polar Biology**, v. 11, n.1, p. 63-72. 1990.

CLARK, A., Murphy, E.J., Meredith, M.P., King, J.C., Peck, L.S., Barnes, D.K.A., Smith, R.C. Climate change and the marine ecosystem of the western Antarctic Peninsula. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences** 362, 149-166. 2007.

CLARK, G. **Staining procedures**. Baltimore: Williams & Wilkins. 1981.

CULICK, B. Fluoride turnover in Adelie penguins (*Pygoscelis adeliae*) and other bird species. **Polar Biol.** 7:179-187. 1987.

DE VRIES, A.L. The role of antifreeze glycopeptides in the freezing avoidance of Antarctic fishes. **Comp. Biochem. Physiol.**, Oxon, v. 90A, p. 611-621. 1988.

DI PRISCO, G.; Maresca, B.; Tota, B. **Biology of antarctic fish**. *Spriger-Verlag*, Berlin, 1991.

DI PRISCO, G., Verde, C. Predicting the impacts of climate change on the evolutionary adaptations of polar fish. **Rev Environ Sci Biotechnol** 5: 309-321. 2006.

DONATTI, L.; Fanta, E. . Influence of photo period on visual prey detection in the antarctic fish *Notothenia neglecta* Nybelin. **Antarctic Science**, Cambridge, v. 14, n. 2, p. 146-150, 2002.

DONATTI, L., Zaleski, T., Calil, P., Fanta, E. Photoperiod and feeding behavior of the Antarctic fish *Notothenia rossii* (Perciformes: Nototheniidae) and functional morphology of chemicals and visual sensory structures used in foraging. **Revista Brasileira de Zoologia** 25, 254-262. 2008.

EASTMAN, J. T.; EAKIN, R. R. Un updated species list for notothenioid fish (Perciformes: Notothenioidei), with comments on Antarctic species. **Arch. Fish. Mar. Res.** 48(1), 11-20, 2000.

EASTMAN, J.T. **The fossil and modern fish faunas of Antarctica: Evolution and Diversity**. In *Biology of Antarctic Fish* (ed. G. di Prisco, B. Maresca & B. Tota), pp 116-130. New York: Springer-Verlag. 1991.

EASTMAN, J.T. Zoogeographic origins and evolution of the modern fauna. **Antarctic Fish Biology** – Evolution in a Unique Environment. San Diego, Academic Press, Inc.1993

EASTMAN, J.T. The nature of the diversity of Antarctic fishes. **Polar Biology** 28, 93-107. 2005.

EASTMAN, J.T., Grande, L. Evolution of the Antarctica fish fauna with emphasis on the recent notothenioids. In: CRAME, J.A. **Origins and evolution of the Antarctica biota**. Geol. Soc. Spec. Publ. V. 47, p. 241-252. 1989.

EICHER, D.L. **O tempo geológico**. Ed. Edgar Blücher, São Paulo. 1982.

EKAU, W. Morphological Adaptations and Mode of Life in High Antarctic Fish. In: DI PRISCO, G., Maresca, B., Tota, B. **Biology of Antarctic Fish**. Berlim: Springer-Verlag, p.23-29. 1991.

EVANS, H. D.; Piermarini, M. P.; Choe, P. K. The Multifunctional Fish Gill: Dominant Site of Gas Exchange, Osmoregulation, Acid-Base Regulation, and Excretion of Nitrogenous Waste. **Physiol Rev** 85: 97–177, 2005.

FANTA, E. ; Luvizoto, M. F. ; Meyer, A. A. N. . Gill structure of the Antarctic Fishes *Notothenia* (*Gobionotothen*) *gibberifrons* and *Trematomus newnesi* (*Nototheniidae*) stressed by salinity changes and some behavioural consequences. *Nankyoku Shiriô (Antarctic Record)*, Tokyo, v. 39, n. 1, p. 25-39, 1995.

FANTA, E., Rios, F.S., Donatti, L., Cardoso, W.E.. Spatial and temporal variation in krill consumption by the Antarctic fish *Notothenia coriiceps*, in Admiralty Bay, King George Island. **Antarctic Science** 15, 458-462. 2003.

FANTA, E. e MACHADO, M.R.. Effects of the organophosphorus methyl parathion on the branchial epithelium of a freshwater fish *Metynnis roosevelti*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. V. 46, n. 3, p. 361-372. 2003.

FERGUNSON, H.W. **Systemic pathology of fish: a text and atlas of comparative tissue responses in diseases of teleostes**. 3ed. Iowa: University Press. 263p. 1995.

FISHER, W., Hureau, J.C. (Eds) FAO Species identification sheets for fishery purposes: Southern Ocean. **Food and Agriculture Organization of United Nations**. Rome, v. 2. 1985.

FISHER, W.; HUREAU, J. C. Oceano austral. Vol II. Roma: **Organizacion de las Naciones Unidas para Alimentacion e la Agricultura**, 474 p, 1988.

GIESEG, S. P.; Cuddihy, S.; Hill, J. V.; Davison, W. A comparison of plasma vitamin C and E levels in two Antarctic and two temperate water fish species. **Comparative Biochemistry and Physiology**. 125:371-378. 2000.

GON, O., Heemstra, P.C. **Fishes of the Southern Ocean**. Grahamstown, South Africa: J.L.B. Smith Institute of Ichthyology, 462p. 1991.

HINTON, D. E.; Baumann, P. C.; Gardner, G. R.; Hawkins, W. E.; Hendrichs, J. D.; Murchelan, R. A.; Okihiro, M. S. **Biomarkers**: Biochemical, Physiological, and histopathological markers of antropogenic stress. Boca Roton: Lewis Publishers, 1992. p.155–208.

HUGHES, G. M. General anatomy of the gills. In: Hoar, W. S.; Randall, D. J. [Eds] **Fish Physiology**. V. 10a, Orlando; Academic Press, 1984. P. 1-72.

HUREAU, J. C. Biologie comparée de quelques poissons antarctiques (Nototheniidae), **Bull. Inst. Océanogr.**, Monaco, v. 68, p 1-244. 1970.

JOHNSON, L.L. Stehr, C.M. Olson, O.P. Myers, M.S. Pierce, S.M. Wigren, C.A. McCain, B.B. Varanasi, U. Chemical contaminants and hepatic lesions in winter flounder (*Pleuronectes americanus*) from the northeast coast of the United States. **Environ. Scienc. Technol.** v. 27, p. 2759-2771, 1993.

JOBLING, S. e SUMPTER, J.P. Detergent components in seware effluent are weakly oestrogenic to fish: an in vitro study using rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. **Aquatic. Toxicol.** v. 27, p. 361-372, 1993.

JOHNSTON, I.A., Clarke, A., Ward, P. Temperature and metabolic rate in sedentary fish from the Antarctic, North Sea and Indo-West Pacific Ocean. **Mar Bio.**, Berlin, v. 191, p. 191-195, 1991.

KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **J Cell. Biol.** 27: 137-138. 1965.

KNOX, G. A. **The biology of the Southern Ocean**. Cambridge University Press, 444pp. 1994.

KNUT SCHMIDT-NIELSEN. **Fisiologia Animal** – Adaptação e Meio Ambiente. 5ª edição; Santos-Livraria Editora, 1996.

KOCK, K.H. **Antarctic fish and fisheries; Studies in polar research**. Cambridge Univ. Press, Cambridge, UK. 359p. 1992.

KOCK, K.H. Marine Habitas – Antarctic Fishes. In: BONNER, W. N., Walton, D. W. H. **Key Environments of Antarctica**, New York: Pergamon Press, p. 173-192, 1985b.

KULENZ, J. Seasonal biology of *Notothenia gibberifrons*, *N. rossii* and *Trematomus newnesi*, as well as reparation of young fish from Admiralty Bay (King George, South Shetland Islands). **Pol. Arch. Hydrobiol.**, Lamianki, v. 41, n. 1, p. 79-102. 1994.

LA MESA, M., Eastman, J.T., Vacchi, M., 2004. The role of notothenioid fish in the food web of the Ross Sea shelf waters: A review. **Polar Biology** 27, 321-338. 2004.

LA MESA, M.; Eastman, J. T.; Licandro, P. Feeding habits of *Bathhydraco marri* (Pisces, Notothenioidei, Bathydraconidae) from the Ross Sea, Antarctica. **Polar Biology**, 30(5): 541-547. 2006.

LAURENT, P. Structure of vertebrate gills. In: Houlihan, D. F.; Rankin, J. C.; Shuttleworth, T. J. **Gills**. Cambridge: Cambridge University, p. 25- -61. 1982.

LU, J., Zheng, j., Liu, H., Li, J., Xu, Q., Chen, K. Proteomics análisis of liver samples from buffer fish *Takifugu rubripes* expomed to excessive fluoride: an insight into

molecular response to fluorosis. **J. Biochem. Molecular Toxicology**, 24 (1) : 21-28. 2010.

LUFT, J. H. Improvements in epoxy resin embedding methods. **J. Bophysical Biochem.Cytol.** New York, 9, 409–414. 1961.

MACDONALD, J. A., Montgomery, J. C., Wells, R. M. G. Comparative physiology of Antarctic fishes. **Adv. Mar. Biol.** V. 24, p. 321-388. 1987.

MALLAT, J. Gill structural changes induced by toxicants and other irritants: a statistical review. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, Ottawa, v. 42, p.630-648. 1985.

MAZEAUD, M.M. & Mazeaud, F. Adrenergic Responses. In PICKERING, A. D. **Stress and Fish**, London: Acad. Press, 367p. 1981.

McCORMICK, S.D. Hormonal control of gill Na⁺, K⁺ - ATPase and chloride cell function. In **Fish Physiology: Cellular and Molecular Approaches to Fish Ionic Regulation**, v.14 (Wood, C. M. & Shuttleworth, T.J., eds), p.285-315. San Diego, Acad. Press. 1995.

MONTEIRO, S.M.; Fontainhas Fernandes, A.; Sousa, M. Morphologic and ultrastructural characterization of the branchial epithelium of teleostean fish. **Rev. Port. Zootec.**, v.XI, p.13-36, 2004.

NICOL, S., De la Mare, W. Ecosystem management and the Antarctic Krill. **American Scientist** 81:36-47. 1993.

OEHLENSCHLAGER, J., Manthey, M. Fluoride content of Antarctic marine animals caught off Elephant Island. **Polar Biol.** 1:125-127. 1982.

OJEDA, F.P. Morphological characterization of the alimentary tract of Antarctic fishes and its relation to feeding habits. **Polar Biol.**, Berlin, v. 5, p 125-128. 1986.

OJHA, J.; ROOJ, N. C.; MITTAL, A. K.; MUNSHI DATTA, J. S. Lightm and scanning electron microscopic studies on the effect of biocidal plant sap on the gills of a hill stream fish, *Garra lanta* (Ham.). **Journal of Fish Biology**, London, v. 34, 165-170, 1989.

PARVEZ, S.; Sayeed, I. & Raisuddin, S. De Decease gill ATPase actives in the freshwater fish *Channa punctata* (Bloch) exposed to diluted paper mill effluent. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 2005.

PEREIRA, J.; Wainer, I.; Campos E. J. D E Haarsma, R. J. Variabilidade climática do oceano austral usando um modelo acoplado no NCAR. **Revista Brasileira de Meteorologia**, v.19, n.2, 113-122, 2004.

PERMITIN, Y. Y., Tarverdiyeva, M. I. The feeding of fish of the family Nototheniidae and Chaenichthyidae of the South Orkneys. **Biol. Morya (Vladivost)**, Vladivostok, v. 2, p. 75-81. 1978.

PERRY, S.F., Reid, S.G., Wankiewicz, E., Iyer, V. & Gilmour, K. M. Physiological responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to prolonged exposure to soft water. **Physiological Zoology**. V. 69, n.6, p 1419-1441. 1996.

PETHE, S.; Boucher, J.; Mansuy, D. Interaction of anions with rat liver arginase: specific inhibitory effects of fluoride. **J. Inorg. Biochem.** 88:397-402. 2002.

POLEKSIC, V., MITROVIC-TUTUNDZIC, V. Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. In: Muller, R., Lloyd, R. **Sublethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish**. Cambridge: Blackwell Sci., 1994. P. 339-352

PORTNER, H.O., **Climate-dependent evolution of Antarctic ectothermes: An integrative analysis. Deep sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography** 53, 1071-1104. 2006.

POUGH, F.H., Janis, C.M., e Heiser, J.B. **A vida dos vertebrados**. 3ª Ed. São Paulo: Atheneu. 2003.

PRUSZAK, Z. Currents circulation in the waters of Admiralty Bay (region of Arctowski Station on King George Island). **Pol. Polar Res.**, Warsaw, v. 1, n. 1, p 55-74. 1980.

RAKUSA-SUSZCZEWSKI, S., Mietus, M. Piasecki, J. Weather and climate. In RAKUSA-SUSZCZEWSKI, S. (Ed.). **The maritime Antarctic coastal ecosystem of Admiralty Bay**, Warsaw: Polish Academy of Sciences, p. 19-25. 1993.

RAKUSA-SUSZCZEWSKI, S. Environmental conditions and the functioning of Admiralty Bay (South Shetland Island) as part of the near-shore Antarctic ecosystem. **Pol. Polar Res.**, Warsaw v. 1, n. 1, p. 11-27. 1980.

RANDALL, D.; Burggren, W.; French, K. **Fisiologia Animal- Mecanismos e Adaptações**. 4ª edição; Ganabara- Koogan, 2000.

RANKIN, J.C.; Stagg, R. M; Bolis, L. Effects of pollutants on gills. In: Houlihan, D. F.; Rankin, J. C.; Shuttleworth, T. J. (Eds.). **Gills**. Cambridge University Press, 1982.

REYNOLDS, E. S. The use of lead citrate at high pH as an electron – opaque stain in electron microscopy. **J. Cell Biology**, New York, 17, 208–212. 1963.

RICHARDSON, M.G. The dietary composition of some Antarctic fish. **Br. Antarct. Surv. Bull.**, Cambridge, n. 41/42, p.113-120. 1975.

RIOS, FLÁVIA SANT'ANNA. **Ecomorfologia do aparato branquial faríngeo do peixe antártico *Notothenia neglecta* NYBELIN (1951) em relação ao hábito alimentar**. 1997.

RIVKIN, R. B., Putt, M. Diel periodicity of photosynthesis in polar phytoplankton: influence on primary production. **Science (Washington DC)**, V. 238, P. 1285-1288. 1987.

SANDS, M., Nicol, S. e Mcminn. Fluoride in Antarctic marine crustaceans. **Marine Biology**, v. 132, n. 4, p. 591-598. 1998.

SCHMIDT-NIELSEN, K. **Fisiologia animal-adaptação e meio ambiente**. 5.ed. São Paulo: Santos, 1996. 546p

SCHUCH, L. A. . O programa antártico brasileiro. **Jornal da Ciência**, Rio de Janeiro, RJ, n. 377, p. 10-10, 1997.

SHARMA, R., Tsuchiya, M. e Bartlett, J. D. Fluoride induces endoplasmic reticulum stress and inhibits protein synthesis and secretion. **Environmental Health Perspectives**, v. 116, n.9, p. 1142-1146. 2008.

SHEPHARD, K.L. Functions for fish mucus. **Review in fish biology and fisheries**. v. 4, p. 401-429, 1994.

SIDELL, B. D. Life at Body Temperatures below 0°C: The Physiology and Biochemistry of Antarctic Fishes. **Gravitational and Space Biology Bulletin** 13 (2), 2000.

SMITH, W. O.; Ainley, D. G.; Cattaneo-Vietti, R. Trophic interactions within the Ross Sea continental shelf ecosystem. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, 362, 95–111. 2007.

SIMÕES, J.C., Arigony-Neto, J, Bremer, U.F. O uso de mapas antárticos em publicações. **Pesquisa Antártica Brasileira** 4 191-197.2004.

TARVERDYIEVA, M.I. Daily food consumption and feeding pattern of the South Georgian cod (*Notothernia rossii marmorata*) and the Patagonian toothfish (*Dissostichus eleginoides*) in the South Georgia area. **J. Ichthyol.**, Bethesda, v. 12, n.4, p. 684-692. 1972.

THOPHON,S., Kruatrachue ,M. ,Upatham, E. S., Pokethityook,P., Saaphong,S. e Jaritkhuan,S. Histopathological alterations of white seabass, *Lates calarifer*, in acute and subchronic cadmium exposure. **Environmental pollution**, v.85, n.03, p.307-320.2003.

TSUTSUI, T., Suzuki, N., Ohmori, M. Sodium fluoride induced morphological and neoplastic transformation, chromosome aberration, sister chromatid Exchange and unsheduled DNA synthesis in culture Syrian hamster embryo cells. **Cancer Res.** 44 (3): 938-941. 1984.

VAN DEN HEUVEL,M.R., Power, M., Richards, J., Mackinnon,M e Dixon,D.G. Disease and gill lesions in yellow perch(*perca flavescens*) exposed to oil sands mining-associated waters. **Ecotoxicology and Environmetal Safety**, v.46, n.3, p.334-341.2000.

VARSAMOS, S., Nebel, C. & Charmantier. Ontogeny of osmoregulation ins postbryonic fish: a review. **Comparative Biochemistry and Physiology**, part A 141, p. 401-429, 2005.

ZANG,Y., Huang,D., Zhao,D., Long,J., Song, G.e Li,A.Long-term toxicity effects of cadmium and lead on Bufo Raddei tadpoles.Bulletin **of Environmetal Contamination and Toxicology**,v.79,n.2,p.178-183.2007.

WANG, Y.N., Xiao, K.Q., Liu, J.L., Dallner, G., Guan, Z.Z., Effect of long term fluoride exposure on lípido composition in rat liver. **Toxicololy** 146, 161-169. 2000.

WATSON, M.L.. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. **J.Biophysical, Biochemi. Cytology**, 4, 4; 475-478. 1958.